

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 790**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2006 E 06847508 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 1957630**

54 Título: **Producción mejorada de glicoproteínas usando manganeso**

30 Prioridad:

08.12.2005 US 748880 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**CROWELL, CHRISTOPHER K. y
GRAMPP, GUSTAVO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 564 790 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

Producción mejorada de glicoproteínas usando manganeso

La presente invención reivindica un beneficio bajo 35 U.S.C § 119 de la de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 60/748,880, la cual fue presentada el 8 de diciembre del 2005

5 Campo de la invención

La invención se relaciona con los métodos y medios de cultivo de células que comprenden manganeso que mejoran la glicosilación o sialilación de glicoproteínas, incluyendo eritropoyetina y análogos o derivados de las mismas.

Antecedentes

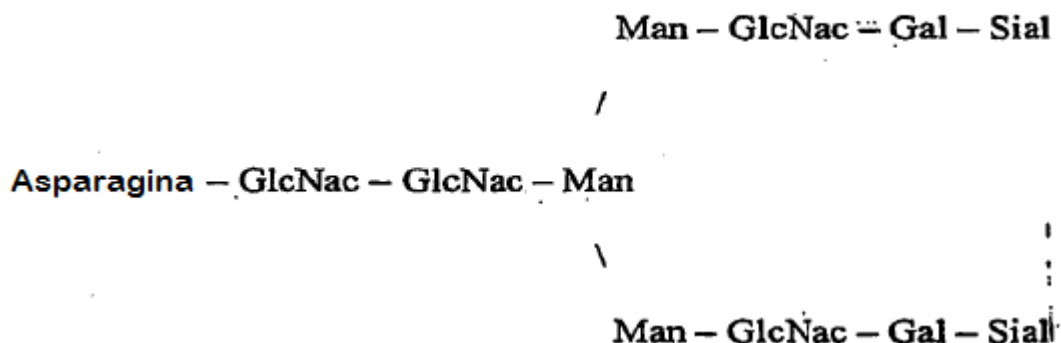
10 La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteína que es normalmente sintetizada y secretada por las células peritubulares en el riñón y funciona como el principal regulador homeostático de la producción celular de glóbulos rojos. La eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) es utilizada clínicamente para el tratamiento de anemias e incrementa la producción celular de glóbulos rojos en numerosas condiciones diferentes, tales como pericirugía, insuficiencia renal crónica, efectos secundarios por VIH o tratamiento de HCV, y efectos secundarios de quimioterapia contra el cáncer. La biosíntesis farmacéutica de glicoproteínas tales como EPO es complicada por la necesidad de altos niveles de expresión y apropiados procesamientos posttranslacionales, lo que implica la adición de cadenas de oligosacáridos ramificadas N-unido y unidas a O. Strnad (2010, Biotechnol Progress, 26(3):653-663) reporta que los parámetros tales como la velocidad de agitación y volumen de funcionamiento pueden afectar la glicosilación de EPO producido por las células CHO.

20 En las glicoproteínas, los azúcares se unen a cualquiera de los átomos de nitrógeno de la amida en la cadena lateral de asparagina (denominado un N-unido) o el átomo de oxígeno en la cadena lateral de serina o treonina (denominado un O-unido). El proceso para formar carbohidratos unidos a N comienza con la adición de 14 monosacáridos a un dicol unido a un lípido en el retículo endoplasmático (ER). Después de su formación, este complejo de carbohidrato luego es transferido a la proteína por el complejo oligosacariltransferasa (OST) en un proceso llamado "glicosilación de núcleo" en el ER. El complejo oligosacariltransferasa (OST) es una unidad mutiproteica que consiste de riboforina I, II, OST48 y DAD1 (Kelleher and Gilmore 1997 PNAS 94(10):4994-4999; Kelleher et al. 2003 Molecular Cell 12(1):101-111; Kelleher et al. 1992 Cell 69(1):55-65).

30 Posteriormente, los polipéptidos son transportados al complejo de Golgi, donde las cadenas de azúcar unidos a O se adicionan y las cadenas de azúcar N-unido son modificadas de diferentes maneras. En los compartimentos cis y medios del complejo de Golgi, el complejo original de 14-sacarido N-unido puede ser recortado a través de la extracción de residuos manosa (Man) y prolongado a través de la adición de N-acetilglucosamina (GlcNac) y/o de residuos de fucosa (FUC). Las diversas formas de carbohidratos unidos a N tienen en común un núcleo pentasacarido que consiste en tres manosas y dos residuos de N-acetilglucosamina. Finalmente, en el trans de Golgi, otros residuos de GlcNac se pueden adicionar, seguido por galactosa (Gal) y un ácido siálico terminal (Sial). El procesamiento de carbohidratos en el complejo de Golgi es llamado "glicosilación terminal" para distinguir este de la glicosilación nuclear.

35 El ácido siálico es un nombre genérico para una familia aproximadamente 30 ácidos monosacáridos de origen natural que son frecuentemente los azúcares terminales de los carbohidratos encontrados en las glicoproteínas y glicolípidos. La sialilación de glicoproteínas recombinantes es muy importante y puede dar propiedades muy significativas a la glicoproteína incluyendo carga, inmunogenicidad, resistencia a la degradación por proteasas, velocidad de depuración plasmática, y bioactividad

40 El complejo final de unidades de carbohidratos puede tomar diferentes formas, alguna de las cuales tiene dos, tres o cuatro ramas (llamadas biantenaria, triantenaria o tetraantenaria). Una estructura biantenaria unida a N de ejemplo, se muestra a continuación:



Un número de enzimas involucradas en la glicosilación utiliza cationes divalentes como cofactores. Por ejemplo, numerosas enzimas involucradas en la síntesis de oligosacáridos unidos a dolicol requieren cationes divalentes como cofactores para la actividad (Couto et al. 1984 J. Biol. Chem. 259(1):378-382; Jensen and Schutzbach 1981 J. Biol. Chem. 256(24):12899-12904; Sharma et al. 1982 European Journal of Biochemistry 126(2):319-25). La enzima que cataliza la adición de carbohidratos unidos a O al polipeptido también requiere un catión bivalente para la actividad (Sugiura et al. 1982 J. Biol. Chem. 257(16):9501-9507). El manganeso (Mn⁺⁺) es un cofactor requerido para la enzima β-galactosida-α-1,3,-galactosiltransferasa, que cataliza la adición de galactosa terminal para alargar los azúcares de N-acetilglucosamina (Witsell et al. 1990 J. Biol. Chem. 265(26):15731-7). Fue previamente reportado que el manganeso en concentración de 0.1 mM o 1mM parcialmente reversa la reducción en ocupación de unidos a N y unidos a O de eritropoyetina causada por A23187, un compuesto que agota los cationes divalentes (Kaufman et al. 1994 Biochemistry 33(33):9813-9). EP 1 085 083 A1 revela un medio de crecimiento para cultivar una célula animal con el fin de obtener una proteína producida por dicha célula. Mientras que el medio puede entre otros contener sulfato de manganeso, los autores no comentan sobre concentración de dicho sulfato de manganeso. WO 98/08934 A1 revela un medio de crecimiento para el cultivo de células huéspedes en la producción de proteínas las cuales se dice que comprenden sales de manganeso, tales como MnCl₂ en una concentración por debajo de 0.01 μM.

Se ha demostrado previamente que rHuEPO contiene tres estructuras ramificadas de carbohidratos unidos a N y unidos a O que son altamente sialiladas (Takeuchi et al. 1988 J. Biol. Chem. 263(8):3657-3663). La EPO des-sialilada es virtualmente inactiva para inducir la eritropoyesis *in vivo* debido a la rápida eliminación de esta proteína modificada por el receptor de glicoproteína aislado de hepatocito (Ashwell and Harford 1982 Annual Review of Biochemistry 51(1):531-554; Goochee et al. 1991 Bio/Technology. 9(12):1347-55). También Yoon et al. (2003, Biotechnol and Bioengineer, 82(3):289-298) enfatizan la importancia de la alta sialilación de EPO para su actividad biológica *in vivo*. Otros estudios han demostrado que la sialilación y glicosilación disminuyen la cinética de enlace de EPO con el receptor de EPO. (Darling et al. 2002 Biochemistry 41(49): 14524-31).

La darbepoetina alfa es un nuevo análogo de glicosilación de la eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) que comprende dos sitios adicionales de glicosilación N-unido. La darbepoetina ha disminuido la actividad del enlace con el receptor, pero exhibe un tiempo de vida media en suero tres veces mayor e incrementa la actividad *in vivo* como resultado de esta persistencia incrementada en la circulación. Se ha demostrado que la actividad *in vivo* de los análogos de EPO se correlaciona con el número de carbohidratos unidos a N. (Elliott et al, Exp Hematol 2004 32 (12): 1146-1155)

La rHuEPO producida en células CHO puede exhibir un grado variable de glicosilación y sialilación. (Takeuchi et al., 1989 PNAS 86(20):7819-22, Zanette et al., 2003 Journal of Biotechnology 101(3):275-287). Dado que la sialilación de EPO es un factor importante en la bioactividad *in vivo*, la consistencia en la glicosilación y los altos niveles de sialilación de rHuEP y sus análogos son cualidades deseables cuando se produce la proteína recombinante para usos terapéuticos. Por lo tanto, existe una necesidad para medios de cultivo y métodos de cultivo que mejoren la glicosilación o sialilación de glicoproteínas producidos en cultivos celulares.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona medios de cultivos que comprenden células huésped CHO y una cantidad no tóxica eficaz de manganeso para incrementar la sialilación de una composición de glicoproteína producida por tales células huésped. Específicamente, la invención proporciona medios de cultivos que comprenden células huésped CHO productoras de glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis y manganeso en una concentración desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 μM, en donde las glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis comprenden (a) la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 3 (eritropoyetina) o fragmentos eritropoyéticos de la

misma; o (b) la secuencia de amino ácidos de la SEQ ID NO: 2 (darbeopetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma.

En una realización de este medio de cultivo, las células huésped secretan una composición eritropoyética.

5 En otra realización de este medio de cultivo, el manganeso está en una concentración desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 μM .

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir una composición eritropoyética que comprende glicoproteínas sialiladas estimulantes de la eritropoyesis, comprendiendo las etapas de: Crecimiento de una célula huésped CHO sensible al manganeso la cual produce una glicoproteína estimulante de la eritropoyesis en un medio de cultivo que comprende una cantidad de manganeso eficaz para incrementar la sialilación de dicha composición eritropoyética producida por dicha célula huésped sensible al manganeso, en donde la concentración del manganeso en dicho medio de cultivo varía desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 μM , y en donde las glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis comprenden (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (eritropoyetina), o fragmentos eritropoyéticos de la misma; (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (darbeopetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma.

15 En una realización, el método incluye además las etapas de recuperación de una composición eritropoyética, en donde menos de aproximadamente 5% de las moléculas estimulantes de eritropoyesis son poco sialiladas.

En otra realización, la cantidad de manganeso es eficaz para incrementar el porcentaje de moléculas estimulantes de eritropoyesis altamente sialiladas.

20 En incluso otra realización, la cantidad de manganeso es eficaz para incrementar el porcentaje de moléculas estimulantes de eritropoyesis que son glicosiladas en sitios potenciales de glicosilación unidos a O.

En una realización adicional, la cantidad de manganeso es eficaz para incrementar el porcentaje de galactosa entre los azúcares unidos a las moléculas estimulantes de eritropoyesis

En otra realización, el medio de cultivo es esencialmente libre de suero.

25 En incluso otra realización, el manganeso está en una concentración desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 μM . En una posterior realización, el manganeso esta una concentración desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 4 μM .

En otra realización, el medio de cultivo comprende además uno o más aminoácidos suplementarios seleccionados del grupo consistente por asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, isoleucina, leucina, triptófano, o valina.

En incluso otra realización, las células huésped son cultivadas en botellas giratorias.

30 En una realización adicional, el manganeso se adiciona después de una fase rápida de crecimiento celular. En otra realización, la fase rápida de crecimiento celular dura por un periodo en un rango entre aproximadamente 2 a 20 días.

En incluso otra realización, el manganeso se adiciona después dos ciclos de cosecha. En otra realización, el primer ciclo de cosecha es aproximadamente 8 días y el segundo ciclo de cosecha es aproximadamente 7 días largos.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 presenta la cantidad de rHuEPO en la fracción que fluye como un porcentaje de la cantidad cargada en la columna y muestra los resultados del medio de cultivo sin adiciones de manganeso, y con la adición de manganeso 4 μM .

40 La figura 2 presenta la cantidad de rHuEPO en la fracción retenida-IEX como un porcentaje de la cantidad cargada en la columna y muestra los resultados del medio de cultivo sin adiciones de manganeso, y con la adición de manganeso 4 μM .

La figura 3 presenta la cantidad de darbeopetina en la fracción retenida-IEX como un porcentaje de la cantidad cargada en la columna; después de cada ciclo de cosecha, y muestra los resultados del medio de cultivo sin manganeso adicionado, y con la adición de manganeso 4 μM .

- La figura 4 presenta el porcentaje de moléculas de rHuEPO en las cuales los sitios-O fueron ocupados con la glicosilación y muestra los resultados del medio de cultivo sin adiciones de manganeso, y con la adición de manganeso 4 μ M.
- 5 La figura 5 presenta el porcentaje de moléculas de darbepoetina en las cuales los sitios-O fueron ocupados con la glicosilación, después de cada ciclo de cosecha, y muestra los resultados del medio de cultivo sin adiciones de manganeso, y con la adición de manganeso 4 μ M.
- La figura 6 presenta el porcentaje de moléculas de darbepoetina en las cuales los sitios-O fueron ocupados con la glicosilación y muestra los resultados de los medios de cultivo con diferentes concentraciones de manganeso.
- La figura 7 presenta las formas representativas de glicosilación identificadas por MALDI-TOF MS.
- 10 La figura 8 presenta el porcentaje de recuperación de rHuEPO altamente sialilada obtenido después del cultivo en medio estándar, medio enriquecido (medio estándar suplementado con aminoácidos), y medio enriquecido con diferentes concentraciones de manganeso.
- La figura 9 presenta el porcentaje de formas de rHuEPO poco sialiladas obtenidas después del cultivo en medio estándar, y medio enriquecido con diferentes concentraciones de manganeso.
- 15 La figura 10 presenta el porcentaje de ocupación de sitios-O mediante glicosilación obtenido después del cultivo en medio estándar, y medio enriquecido con diferentes concentraciones de manganeso.
- Descripción detallada de la invención
- La invención proporciona medios de cultivo y métodos de cultivo celular que mejoran la sialilación de glicoproteínas particularmente moléculas estimulantes de eritropoyesis tales como eritropoyetina de SEQ ID NO: 3, o análogos, variantes, o derivados de las mismas, incluyendo darbepoetina de SEQ ID NO: 2.
- 20 Las glicoproteínas recombinantes producidas en células CHO pueden exhibir glicosilación y sialilación variables. Formas altamente sialiladas de moléculas de glicoproteínas pueden ser separadas desde formas poco sialiladas (incluyendo las no sialiladas) de tales moléculas mediante cromatografía de intercambio aniónico. Los ácidos siálicos, siendo ácidos y de este modo cargados negativamente, son capturados en la columna, por lo que las moléculas altamente sialiladas son retenidas en la columna mientras que las formas poco sialiladas fluyen. La cantidad de glicoproteínas en cada fracción (fracción retenida en la columna vs fracción que fluye) puede ser determinada y comparada con la cantidad inicial de glicoproteína cargada desde el medio de cultivo celular.
- 25 Se ha demostrado en este documento que la adición de manganeso al medio de cultivo resulta en alteraciones significantes en el procesamiento postraslacional de las moléculas estimulantes de la eritropoyesis, tales como la eritropoyetina y darbepoetina, mediante la producción de células cultivadas que producen eritropoyetina. El manganeso disminuye la cantidad de glicoproteína poco sialilada producida (y aumenta la cantidad de glicoproteína altamente sialilada recuperada), aumenta el número potencial de sitios de glicosilación unidos a O que están ocupados por cadenas de azúcar, aumenta el número de potenciales sitios de glicosilación unidos a N que están ocupados por las cadenas de azúcar, aumenta la galactosilación terminal de cadenas de azúcar, e incrementa la sialilación terminal de las cadenas de azúcar. El manganeso no parece alterar el grado de ramificación de las cadenas de azúcar (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro ramas). El manganeso también invierte la reducción de sialilación observada cuando el medio de cultivo es periódicamente suplementado con aminoácidos agotados durante el cultivo celular, por ejemplo, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, isoleucina, leucina, triptófano y valina.
- 30 El término "composición eritropoyética" como se utiliza en este documento significa una recolección de moléculas estimulantes de la eritropoyesis que contienen sitios de glicosilación, y entre los cuales al menos algunas de las moléculas llevan una cadena de azúcar que comprende al menos un residuo siálico terminal (i.e., tales moléculas son "sialiladas"). Del mismo modo, el término "composición de glicoproteína" tal como se utiliza en este documento significa una recolección de moléculas de glicoproteína, entre las cuales al menos algunas de las moléculas están sialiladas.
- 35 El término "moléculas estimulantes de la eritropoyesis" como se utiliza en este documento incluye eritropoyetina humana (SEQ ID NO.:3) o una variante biológicamente activa, derivado o análogo de la misma, incluyendo un derivado químicamente codificado de dicha proteína o análogo. Los aminoácidos 1 a 165 de SEQ ID NO: 3 constituyen la proteína madura. Otro ejemplo, de molécula estimulante de la eritropoyesis es la darbepoetina (SEQ ID NO: 2). Los aminoácidos 1 a 165 de SEQ ID NO: 2 constituyen la proteína madura. También se contemplan análogos de eritropoyetina (SEQ ID NO.: 3) o darbepoetina (SEQ ID NO: 2), con una homología del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 2, respectivamente, y aun reteniendo la actividad eritropoyética.
- 40
- 45
- 50

Las secuencias de ejemplo, fabricación, purificación y uso de la eritropoyetina humana recombinante de ejemplo, se describen en una serie de publicaciones de patentes, incluyendo, pero no limitado a la Patente de los Estados Unidos Lin 4,703,008 y la Patente de los Estados Unidos Lai et al. 4,667,016. La darbepoetina es una eritropoyetina análoga hiperglicosilada que presenta cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de la rHuEPO lo cual provee dos cadenas de carbohidratos adicionales. Más específicamente, la darbepoetina contiene dos cadenas adicionales de carbohidratos unidos a N en los residuos de aminoácidos 30 y 88 de SEQ ID. NO: 2. Las secuencias, fabricación, purificación y uso de ejemplo, de darbepoetina y otros análogos de eritropoyetina se describen en una serie de publicaciones de patentes, incluyendo Strickland et al., 91/05867, Elliott et al., WO 95/05465, Egrie et al., WO 00/24893, y Egrie et al. WO 01/81405.

Como se utiliza en este documento, "análogos" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene inserciones, eliminaciones o sustituciones relativas a una secuencia original, mientras que todavía sustancialmente mantenga la actividad biológica de la secuencia original, como se determinó mediante ensayos biológicos conocidos para un experto en el arte. "Variantes" incluyen variantes alélicas que ocurren naturalmente, variantes de corte y empalme, o formas polimórficas de la secuencia original. Los "Derivados" de polipéptidos de origen natural, variantes o análogos incluyen aquellos que han sido químicamente modificados, por ejemplo, unir polímeros solubles en agua (por ejemplo, polietilenglicol), radionucleidos u otros diagnósticos o unidades estructurales dirigidas o terapéuticas, cualquiera de los cuales se puede unir directa o indirectamente a través de enlazantes.

El término "actividad eritropoyética" significa actividad para estimular eritropoyesis como se demuestra en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, el ensayo de policitemia exhipóxica en ratón. Véase, por ejemplo, Cotes and Bangham, Nature, 191:1065 (1961).

El término "célula huésped sensible al manganeso" como se utiliza en este documento significa una célula huésped la cual produce una glicoproteína y que responde a una adición de manganeso en su medio de cultivo incrementando la sialilación, ya sea mediante un aumento del porcentaje de las moléculas de glicoproteína sialilada producidas o aumentando el grado de sialilación (i.e., el número de ácidos siálicos por molécula) de las moléculas de glicoproteína producidas. Para composiciones eritropoyéticas, las células huésped sensibles a manganeso incluyen las células huésped que responden a la adición de manganeso aumentando el porcentaje de moléculas estimulantes de la eritropoyesis altamente sialiladas recuperadas después de una cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo como se describe a continuación. En realizaciones de ejemplo, las células huésped sensibles al manganeso pueden incluir células huésped de crecimiento ancladas a una superficie sólida, por ejemplo, en botellas giratorias. Cualquier célula huésped sensible al manganeso descrita en este documento pueden ser utilizada de acuerdo con la invención.

Componentes del medio de cultivo

La invención proporciona un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de manganeso para incrementar la sialilación de una composición de glicoproteína producida por células crecidas en este medio de cultivo. En una realización, dicha cantidad de manganeso no es tóxica para las células, i.e., no reduce la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de proteínas. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de manganeso para aumentar la sialilación de una composición eritropoyética producida por las células crecidas en este medio de cultivo.

La cantidad de manganeso en los medios de cultivo de la invención pueden ser mayores que la cantidad "elemento de traza" presente en las composiciones del medio estándar, por ejemplo, superiores a 0.001 μM . Mientras la calidad de las composiciones eritropoyéticas claramente mejorada por la adición de manganeso 40 μM para los cultivos de células huésped, en algunos casos, el rendimiento de proteína secretada en el medio es sustancialmente reducida, indicando un efecto tóxico de dicha concentración de manganeso. En realizaciones de ejemplo, la concentración de manganeso en el medio de cultivo (i.e., la concentración final después del medio suplementado de manganeso se adiciona a las células huésped en cultivo) varía desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 μM , o desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 μM , o desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 4 μM . En otras realizaciones de ejemplo, la concentración de manganeso en el extremo inferior del intervalo deseado puede variar desde aproximadamente 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 o 4 μM o superior; la concentración de manganeso en el extremo superior del intervalo puede también alcanzar hasta aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6,5 o 4 μM .

La concentración de manganeso en el medio de cultivo adicionado a las células puede ser ajustada para lograr la concentración final deseada de manganeso en el sistema de cultivo. Por ejemplo, con procesos por lotes que involucren remoción y sustitución completa del medio de cultivo, el remplazo del medio de cultivo que contenga Mn^{2+} 4 μM se adiciona a las células para lograr un medio de cultivo final en Mn^{2+} 4 μM . Alternativamente, cuando se utilizan procesos de perfusión continuos, la concentración de manganeso en el medio adicionado necesitara ser mayor para lograr un medio de cultivo final en la concentración deseada de Mn^{2+} dentro de un intervalo. Los ajustes de la concentración se pueden llevar a cabo fácilmente por un experto en el arte.

5 El medio de cultivo también puede incluir otros ingredientes necesarios o deseables conocidos en el arte, tales como carbohidratos, incluyendo glucosa, aminoácidos esenciales y/o no esenciales, lípidos y precursores de lípidos, precursores de ácidos nucleicos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos incluyendo metales raros, y/o factores de crecimiento celular. El medio de cultivo puede ser químicamente definido o puede ser suero, hidrolizados de plantas, u otras sustancias derivadas. Los medios de cultivo pueden ser esencial o totalmente libres de suero o libres de componentes animal. Esencialmente libres de suero significa que el medio carece de cualquier suero o contiene una cantidad insignificante de suero.

10 El medio de cultivo también puede incluir aminoácidos suplementarios agotados durante el cultivo celular, por ejemplo, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, isoleucina, leucina, triptófano, y valina. La suplementación de aminoácidos puede estar en el medio inicial de crecimiento y/o en el medio agregado durante o después de la fase de rápido crecimiento.

15 El medio puede incluir lípidos y/o precursores de lípidos tales como colina, etanolamina, o fosfoetanolamina, colesterol, ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ésteres metílicos, D-alfa-tocoferol, por ejemplo, en forma de acetato, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico; o ácido araquidónico. Un número de mezclas de lípidos disponibles comercialmente son accesibles.

20 El medio puede incluir un suplemento de hierro que comprende hierro y una molécula de transporte sintética a la cual el hierro se une. El medio puede incluir compuestos inorgánicos u oligoelementos, suministrados como sales apropiadas, tales como sodio, calcio, potasio, magnesio, cobre, hierro, zinc, molibdeno, vanadio, manganeso, níquel, silicio, estaño, aluminio, bario, cadmio, cromo, cobalto, germanio, potasio, plata, rubidio, circonio, flúor, bromo, yodo y cloruro. Una serie de mezclas disponibles comercialmente de oligoelementos están disponibles.

El medio también puede incluir opcionalmente un surfactante no iónico o agente con actividad de superficie para proteger las células desde él se mezcla o aireación. El medio de cultivo también puede comprender soluciones reguladoras tales como bicarbonato de sodio, fosfatos monobásicos y dibásico, HEPES y/o Tris.

25 En realizaciones de ejemplo, el medio es medio DMEM/F-12 (Gibco) que contiene un 5 % de suero. DMEM incluye las siguientes sales inorgánicas: cloruro de calcio, sulfato cúprico, sulfato o nitrato férrico, cloruro de potasio, sulfato o cloruro de magnesio, cloruro de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de zinc; los siguientes aminoácidos L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína, ácido L-glutámico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina-L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina; los siguientes lípidos y vitaminas: biotina, D- pantoenato de calcio-, cloruro de colina, ácido fólico, 30 mioinositol, niacinamida, nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina B12 (cobalamina), timidina, ácido linoleico, ácido lipoico; y otros componentes incluyendo D-glucosa, rojo fenol, hipoxantina, piruvato sódico, putrescina, y HEPES.

35 El medio de cultivo también puede comprender inductores de la producción de proteína, tales como, butirato de sodio, o cafeína. Otros inductores conocidos incluyen, pero no se limitan, a los siguientes compuestos: N-acetil-L-cisteína, actinomicina D, 7- amino, bafilamicina A1, Streptomyces griseus, calfoestina C, Cladosporium cladosporioides, camptotecina, camptotheca acuminata, CAPE, 2-cloro-2'-deoxiadenosina, 2-cloro-2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato, Tetralitio Sal, cicloheximida, ciclofosfamida monohidratada, ciclosporina, trichoderma polisporum, daunorrubicina, clorhidrato, dexametasona, doxorubicina clorhidrato, (-) epigalocatequina galato, etopósido, etopósido fosfato, ET- 18-OCH3, 5-fluorouracilo, H-7, diclorhidrato, genisteína, 4-hidroxi-nonenal, 4-hidroxi-fenilretinamida, hidroxiiurea, inhibidor de 40 IL-1 β , (6)-s-n-nitroso-n-acetilpenicilamina, S-nitrosoglutation, forbol-12-miristato-13-acetato, puromicina, diclorhidrato, ácido 1-pirrolidincarboditioico, sal de amonio, quercetina dihidrato, rapamicina, butirato de sodio, 4-fenilbutirato de sodio, D- eritro esfingosina, N-acetil, D- eritro -esfingosina, N-octanoil-, estaurosporina, Streptomyces sp., sulindac, tapsigargina, TRAIL, E. coli, Trichostatin A, Streptomyces sp., (\pm)-verapamilo clorhidrato, veratridina, vitamina D3, 1 α ,25-dihidroxi, y vitamina E succinato (VWR y Calbiochem).

45 El medio de cultivo opcionalmente excluye A23187 u otros compuestos los cuales agotan cationes divalentes.

Medios de Cultivo

50 La invención también proporciona métodos para la producción de una composición de glicoproteína, tales como una composición eritropoyética, la cual puede incluir cultivo de célula huésped sensible a manganeso en cualquiera de los medios de cultivo descritos en este documento. Tales métodos pueden incluir además la etapa de recuperación de la composición de glicoproteína, por ejemplo, la composición eritropoyética a partir de las células huésped o del medio de cultivo. El manganeso puede ser incluido en el medio de cultivo inicial durante la fase inicial de crecimiento o se puede ser adicionado en estados posteriores. El manganeso puede tener un mayor efecto cuando se adiciona después de una fase de rápido crecimiento durante el cual el crecimiento de células huésped máximo cercano o al máximo se consigue, por ejemplo, en un periodo mayor de 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 o 22 días, o hasta 22, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o 55 días y puede

5 tener un efecto aun mayor después del crecimiento celular prolongado, por ejemplo, después de dos ciclos de cosecha. Cuando la proteína recombinante es secretada en el medio, el medio puede ser cosechado periódicamente, de modo que las mismas células huésped puedan ser usadas a través de diferentes ciclos de cosecha. En realizaciones de ejemplo, las células huésped productoras de moléculas estimulantes de eritropoyesis se incubaron en tres lotes discretos de ciclos de cosecha. Para cada ciclo, el medio es cosechado y reemplazado con medio fresco. El primer ciclo puede ser de, por ejemplo, 8 días, el segundo ciclo, por ejemplo, 7 días; y el tercer ciclo, por ejemplo, 5 días de duración.

10 Cualquiera de las células huésped conocidas en el arte para producir proteínas glicosiladas pueden ser usadas, incluyendo células de levadura, células de plantas, plantas, células de insectos, y células de mamífero. Células de levadura de ejemplo, incluyen *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, y *Saccharomyces* por ejemplo, *S. cerevisiae*, así como *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *K. Zactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickeramii*, *K. waltii*, *K. drosophilorum*, *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *K. yarrowia*; *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Totypocladium*, *Aspergillus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Células de insecto de ejemplo, incluyen *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*, y *Drosophila*. Células de mamífero de ejemplo incluyen variedades de CHO, BHK, HEK-293, NS0, YB2/3, SP2/0, y células humanas tales como PER-C6 o HT1080, así como VERO, HeLa, COS, MDCK, NIH3T3, Jurkat, Saos, PC-12, HCT 116, L929, Ltk-WI38, CV1, TM4, W138, Hep G2, MMT, una línea celular leucémica, células madre embrionaria o células de huevo fertilizado.

20 Una variedad de sistemas de cultivo es conocida en el arte, incluyendo matraces T, centrifugadora y matraces agitadores, botellas giratorias y biorreactores de tanques agitadores.

25 El cultivo en botellas giratorias es generalmente llevado a cabo sembrando las células en las botellas giratorias que están parcialmente llenas (por ejemplo, a un 10-30% de capacidad) con medio y ligeramente giradas, permitiendo que las células se fijen a las paredes de las botellas y crezcan hasta la confluencia. El medio celular es cosechado mediante decantación del sobrenadante, el cual es reemplazado con medio fresco. El anclaje de las células dependientes puede ser también cultivado sobre un microportador, por ejemplo, esferas poliméricas, que están mantenidas en suspensión en biorreactores de tanques agitadores. Alternativamente, las células pueden estar creciendo en suspensión de una sola célula.

30 El medio de cultivo puede ser adicionado en un proceso de lotes, por ejemplo, en donde el medio de cultivo se adiciona una vez a las células en un solo lote, o en un proceso de alimentación de lote en el cual pequeños lotes de medio de cultivo son periódicamente adicionados: El medio puede ser cosechado al final del cultivo o en diferentes momentos durante el cultivo. Continuamente los procesos de producción perfundidos son también conocidos en el arte, e involucran la alimentación continua de medio fresco en el cultivo, mientras que el mismo volumen es continuamente retirado del reactor. Los cultivos perfundidos generalmente alcanzan las más altas densidades celulares que los lotes de cultivo y pueden ser mantenidos por semanas o meses con cosechas repetidas.

35 Los métodos para controlar la sialilación de una glicoproteína recombinante, particularmente para controlar los niveles de ácido N-glicolilneuraminico (NGNA) en las cadenas de azúcar, se describen en la patente la Patente de los Estados Unidos No. 5,459,031, y tales métodos pueden ser usados en conjunto con el medio de cultivo y los métodos de cultivo descritos en este documento. Los métodos implican ajustes en los parámetros del cultivo, incluyendo el nivel de dióxido de carbón, para llevar a cabo el deseado contenido de NGNA en el carbohidrato.

40 Evaluación de glicosilación y sialilación

45 Para las composiciones de glicoproteína, un incremento o mejoramiento en la sialilación se puede determinar mediante cromatografía de intercambio aniónico de acuerdo con Elliott et al., *Biochemistry*, 33(37):11237-45 (1994). Las proteínas más altamente sialiladas se espera que estén negativamente más cargadas y unidas más fuertemente a la columna, mientras que las proteínas menos sialiladas y asialoproteínas fluyan a través o sean fácilmente eluías. Se puede determinar la cantidad de moléculas de glicoproteína en cada una de las dos fracciones (fracción retenida sobre resina vs. fracción fluida), mediante ELISA, y se compara con la cantidad inicial de tales moléculas cargadas desde el medio de cultivo celular. Los kits ELISA de ejemplo, se venden comercialmente e incluyen sistemas R & D, y kit IVD Humana EPO EIA.

50 La cromatografía se lleva a cabo de la siguiente manera. Para eliminar células y residuos, el medio en el cual las células mamíferas que producen moléculas estimulantes de eritropoyesis, u otras glicoproteínas, que han sido cultivadas son centrifugadas a aproximadamente 1000 rpm y filtradas a través de filtro de 0.45 micras. Este material luego es sometido a una cromatografía de intercambio aniónico con el fin de prepurificar una fracción que contiene primariamente las cuatro a siete especies más altamente sialiladas de las moléculas de glicoproteína. Una resina de intercambio fuertemente iónico se puede utilizar, tal como, por ejemplo, TRICORN™ Mono-Q 5/50 GL (Amersham, part # 7-5166-01) u otra resina de intercambio fuertemente aniónica, particularmente aquellas que tienen el amino cuaternario -CH₂-N+-

(CH₃)₃ como grupo funcional de la resina. El procedimiento exacto dependerá del número máximo teórico de residuos de ácido siálico que las moléculas particulares de glicoproteína puedan contener. Por ejemplo, un número máximo teórico de residuos de ácido siálico para eritropoyetina humana, que tenga 3 sitios N-galicano y 1 sitio de O-galicano; es $(3 \times 4) + 2 = 14$. Esto asume que cada sitio de N-galicano puede tener hasta cuatro ramas (dado que las especies pentaantenarias son raras) y que cada sitio de O-galicano pueda tener hasta dos ramas. Haciendo suposiciones similares para darbepoetina, la cual tiene 5 sitios N-galicano y 1 sitio O-galicano, el máximo teórico para darbepoetina es $(5 \times 4) + 2 = 22$. Las soluciones reguladoras utilizadas para eluir las moléculas de glicoproteína desde la columna de intercambio aniónico son diseñadas para: (1) eluir desde la columna la mayoría o todas las moléculas de proteína pertenecientes a especies que estén menos sialiladas que un grupo de especies consistentes de aproximadamente la tercera parte superior de la mayoría de especies sialiladas (para eritropoyetina, las especies "altamente sialiladas" son aquellas que tienen de 9-14 residuos de ácido siálico por molécula de proteína, y para darbepoetina las especies "altamente sialiladas" son aquellas que tienen de 17-22 residuos de ácido siálico por molécula de proteína); (2) luego eluir moléculas de proteína pertenecientes a las cuatro de las siete especies altamente sialiladas, y (3) finalmente remover las especies más altamente cargadas de la columna, lo cual puede incluir glicofomas que llevan N-glicanos sulfatados. Por lo tanto, la composición exacta de las soluciones reguladoras de lavado y de elución pueden ser ajustados de acuerdo con el número máximo teórico de residuos de ácido siálico en la molécula de glicoproteína. Un experto en el arte puede hacer dichos ajustes basado en la optimización empírica de la rutina de los parámetros de la columna y evaluando el material saliente de la columna sobre geles analíticos de enfoque isoelectrico.

Los geles analíticos de enfoque isoelectrico de poli(acrilamida) que pueden separar diferentes formas cargadas de moléculas estimulantes de eritropoyesis que llevan diferentes números de residuos de ácido siálico también pueden ser mejorados esencialmente como se describe en el Amersham-Pharmacia Guide to Isoelectric Focusing (APB, RW 5/5/98) en urea 6 M utilizando anfolitos comercialmente disponibles (pH 3 a 5 para eritropoyetina humana o pH 2 a 4 para darbepoetina). Otros rangos de pH para anfolitos pueden ser apropiados para otras moléculas estimulantes de eritropoyesis con números sustancialmente diferentes de residuos de ácido siálico.

Para eritropoyetina, el grado de sialilación se estima mediante la determinación del porcentaje total de proteína eritropoyética cargada sobre una columna de intercambio aniónico que eluye en una fracción que comprende principalmente especies altamente sialiladas de eritropoyetina que tienen de 9 a 14 residuos de ácido siálico por molécula de proteína.

Para darbepoetina, el grado de sialilación se estima mediante la determinación del porcentaje de proteína eritropoyética total cargada sobre una columna de intercambio aniónico que eluye en una fracción que contiene principalmente especies altamente sialiladas de darbepoetina que tiene de 18 a 22 residuos de ácido siálico por molécula.

Un incremento en el porcentaje de moléculas estimulantes de eritropoyesis recuperadas desde la mezcla retenida en la resina (o una reducción en el porcentaje de tales moléculas observadas en la fracción que fluye) respecto al control (por ejemplo, producidas desde el medio sin manganeso o cantidades de oligoelementos del manganeso) indica un incremento en la sialilación, ya sea mediante el aumento del porcentaje de moléculas sialiladas producidas o mediante el incremento de su grado de sialilación.

La estructura actual de glicano puede ser determinada por algunas técnicas conocidas en el arte, incluyendo digestión enzimática de carbohidratos, inmunotransferencia de lectina, 1D y 2D, espectroscopia ¹H-RMN, técnicas de espectrometría de masas incluyendo espectrometría de masas en tándem de ionización electroaspersión (ESI MS) o espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante desorción-ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), y/o marcadores fluorescentes de N-glicanos liberados enzimáticamente seguidos de resolución mediante HPLC y comparación con muestras control conocidas de N-glicano.

Una técnica de ejemplo, descrita en los ejemplos a continuación, para determinación de la cantidad de glicoproteína con un sitio de O-glicosilación ocupado implica una digestión con N-Glicanasa para remover los carbohidratos unidos a N seguido de HPLC en fase reversa para separar la composición de glicoproteína en dos picos. La identificación del pico como sitio-O ocupado o sitio-O no ocupado puede ser confirmado por espectrometría de masas.

La derivación y sialilación del sitio-N, incluyendo el porcentaje de moléculas sialiladas producidas y el grado de sialilación de las moléculas sialiladas, se puede determinar mediante análisis de las glicoproteínas para el contenido estructural, mediante el mapeo de N-galicano y secuenciación enzimática, por ejemplo, mediante digestión con N-Glicanasa y neuraminidasa, acoplado con espectrometría de masas MALDI-TOF para la determinación del tamaño de los azúcares liberados. Una técnica de ejemplo, se describe en los ejemplos a continuación.

Se puede determinar el porcentaje de azúcares unidos a las moléculas estimulantes de eritropoyetina que son galactosa, por ejemplo., mediante digestión con neuraminidasa más galactosidasa seguido de separación por HPLC o espectrometría de masas MALDI-TOF para la determinación del tamaño de los azúcares liberados. Una técnica de ejemplo, se describe en los ejemplos a continuación.

Ejemplos**Ejemplo 1:**

Métodos de producción de proteína

5 Este ejemplo, describe un método de cultivo celular para la producción de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO, SEQ ID NO: 3) o darbepoetina (SEQ ID NO: 2). Una línea celular DHFR menos CHO fue transfectada establemente con una secuencia de ADN genómico que contiene el gen de eritropoyetina humano (la Patente de los Estados Unidos Lin 4,703,008) o una secuencia de ADNc codificada al gen de darbepoetina (SEQ ID NO: 1). Botellas rotatorias (850cm²) fueron inoculados con 1.7x10⁷ de células totales y crecidas durante 5 días en 450 mL de medio 1:1 DMEM/F-12 (Gibco), que contiene 5% de suero. Los cultivos se lavaron una vez con PBS y luego se incubaron en tres ciclos de cosecha en lotes discreto. El medio fue reemplazado dos veces en los primeros 14 días; el tercer ciclo fue de 5 a 6 días de duración. Para la eritropoyetina, en cada cosecha, el medio de cultivo acondicionado fue completamente removido y 1:1 DMEM/F-12 sin suero ("medio estándar") fue adicionado para reemplazar el medio de cosecha. Cuando el manganeso fue incluido en el medio de cultivo, se adicionó cloruro de manganeso (Sigma) para reemplazar todo el medio de cultivo en la concentración deseada; por ejemplo, 0.4, 4 o 40 µM. Las botellas giratorias fueron recubiertas con una mezcla de gas que contiene 80 torr de pCO₂, 130 torr de pO₂, y N₂ balanceado después de cada adición al medio. Las células productoras de darbepoetina fueron cultivadas bajo condiciones similares a las células productoras de eritropoyetina excepto que el medio estándar fue 2X 1:1 DMEM/F-12 (sin suero):

Ejemplo 2:

Cuantificación de rHuEPO o darbepoetina en medio de cultivo de cosecha

20 200 ml de medio de cosecha producido de acuerdo con el ejemplo 1, se analizó para la cantidad de rHuEPO o darbepoetina producida, utilizando HPLC fase reversa. Las muestras fueron separadas sobre un polímero PLRPS (4.6 mm x 150 mm; 1000 Å (Polymer Laboratories) bajo condiciones de fase reversa (gradiente lineal AB desde 30% - 55% B durante 17 minutos; solución reguladora A: 0.1% de TFA en H₂O, solución reguladora B: 0.1% de TFA en 90% de CH₃CN (Sigma)). El tiempo de retención para rHuEPO o darbepoetina dentro del medio de cultivo fue comparado con una rHuEPO purificada o estándar de darbepoetina (Amgen Inc.). El Software Waters Millennium fue usado para integrar manualmente las áreas de los picos de rHuEPO o darbepoetina para asegurar una integración consistente. Las áreas de los picos integrados de muestras desconocidas se cuantificaron mediante la comparación a una curva estándar conocida.

Ejemplo 3:

30 Efecto del manganeso sobre formas altamente sialiladas y poco sialiladas de moléculas estimulantes de eritropoyetina

Las células CHO productoras de rHuEPO fueron cultivadas como se describe en el ejemplo 1, con y sin adición de MnCl₂ 4 µM. El medio acondicionado recolectado después del tercer ciclo de cosecha se analizó mediante el porcentaje de recuperación de las formas altamente sialiladas de rHuEPO. Las células CHO productoras de darbepoetina fueron cultivadas como se describe en el ejemplo 1, con y sin adición de MnCl₂ 4 µM. El medio acondicionado recolectado después de cada uno de los tres ciclos de cosecha se analizó.

Las formas poco sialiladas de rHuEPO fueron separadas del material altamente sialilado utilizando el método de intercambio aniónico como se describe en Elliott et al., Biochemistry, 33(37):11237-45 (1994). En resumen, la rHuEPO altamente sialilada, que tiene una fuerte carga negativa, se une a la resina mientras que la rHuEPO poco sialilada se lava a través de la columna. El medio de cultivo celular de cada botella giratoria obtenido como se describe en el ejemplo 1, en primer lugar, se concentró sesenta veces, a aproximadamente 5-15 mg/mL, utilizando una membrana 10,000 MWCO luego la solución reguladora se intercambió por Tris 10 mM pH 7.0. Este medio de solución reguladora concentrado e intercambiado fue cargado sobre una columna de intercambio fuertemente aniónica que tiene una amina cuaternaria como grupo funcional. El material no unido que fluye con Tris 10 mM o eluido con baja sal fue recolectado como la fracción poco sialilada. El material unido a la columna de intercambio iónico (IEX) fue eluido con sales superiores como la fracción "recuperable" altamente sialilada.

La cantidad total de rHuEPO en una o ambas fracciones fue medida utilizando un kit ELISA obtenido de R&D Systems (Quantikine IVD Human EPO EIA kit), siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes y comparado con la cantidad total de rHuEPO en el medio de cosecha cargado en la columna. Las diluciones de 1:1,000,000 y 1:500,000 de cada una de las muestras que flúan se hicieron antes del análisis con el fin de que caigan dentro de la curva de la valoración. Una fracción altamente sialilada de darbepoetina se separó utilizando métodos similares como se describió anteriormente para aislar las isoformas con los residuos 17-22 de ácido siálico y medidos utilizando RP-HPLC.

5 Los resultados de un experimento representativo para rHuEPO se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 1 presenta la cantidad de rHuEPO en la fracción que fluye como el porcentaje de la cantidad cargada en la columna y muestra que la adición de manganeso 4 μM redujo la fracción poco sialilada de EPO comparada con el control del 10.01% a 3.39%. La figura 2 presenta la cantidad de rHuEPO en la fracción retenida por IEX como porcentaje de la cantidad cargada en la columna y muestra como la adición de manganeso 4 μM incrementa el porcentaje recuperable de EPO en la fracción altamente sialilada comparada con el control del 24% al 28%.

10 Los resultados de un experimento representativo para darbepoetina se muestran en la figura 3. La figura 3 presenta los datos desde cada ciclo de cosecha y muestra que la adición de manganeso 4 μM incrementa el porcentaje de recuperación de darbepoetina en la fracción altamente sialilada comparada con el control del 32.8% al 36.3% después de la tercera cosecha. La adición posterior de N-acetilmanosamina 7 μM parece que mejora un incremento adicional en % recuperable de darbepoetina al 41.1% después de la tercera cosecha:

Estos datos demuestran que la adición de Mn^{2+} al medio de cultivo disminuye la producción de formas poco sialiladas de eritropoyetina y darbepoetina en células de cultivo CHO, e incrementa el porcentaje de recuperación de formas altamente sialiladas.

15 En experimentos llevados a cabo con una línea de células CHO adaptadas para el crecimiento en cultivo en suspensión en grandes tanques y/o células CHO adaptadas a cultivo en suspensión en medio libre de suero, no se observó el efecto del manganeso en la fracción poco sialilada de darbepoetina.

Ejemplo 4:

Caracterización de sitios-O de rHuEPO

20 Las células CHO productoras de rHuEPO fueron cultivadas como se describe en el ejemplo 1, con y sin adición de MgCl_2 4 μM . El medio de cultivo recolectado sin fraccionar después del tercer ciclo cosechado se analizó por el porcentaje de ocupación del sitio-O de rHuEPO. Las células CHO productoras de darbepoetina fueron cultivadas como se describe en el ejemplo 1, con y sin adición de MgCl_2 4 μM . El medio acondicionado recolectado después de cada uno de los tres ciclos de cosecha se analizó. Las células CHO productoras de darbepoetina fueron también cultivadas como se describe en el Ejemplo 1 con MgCl_2 0.4, 1, 4, 10 y 40 μM y el medio del tercer ciclo de cosecha se analizó.

25 El porcentaje de sitios-O unidos ocupados con glicosilación se cuantificó en primer lugar retirando las estructuras N-unido, mediante la digestión con N-Glicanasa (Sigma) del medio de cultivo celular, seguido por cromatografía HPLC fase reversa. Específicamente, 5 U de N-Glicanasa (Sigma) se adicionó a 10 μL de muestras de medio de cultivo concentrado (1:60) y digeridas a 37 $^\circ\text{C}$ por tres horas. A continuación., las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase reversa utilizando una columna Zorbax C-8 (150 mm x 2.1 mm (VWR) utilizando un gradiente lineal AB desde 35% - 60% de B, durante 30 minutos (solución reguladora A: 0.1% de TFA en H_2O , solución reguladora B: 0.1% de TFA en 90% de CH_3CN (Sigma)). El cromatograma resultante separa rHuEPO en dos picos; el primer pico corresponde al sitio-O ocupado por el péptido rHuEPO mientras que el más pequeño, el segundo pico corresponde a sitios-O no ocupados por el péptido rHuEPO.

30 Para confirmar que estos dos picos representaran sitios-O ocupados y sitios-O no ocupados, las fracciones correspondientes a estos picos fueron recolectadas y comparadas a rHuEPO purificada digerida con N-Glicanasa (Amgen Inc.). El análisis por SDS-PAGE mostró que la digestión con N-Glicanasa reduce el peso molecular aparente de rHuEPO de 32 kDal a un doblete con un mayor componente de 18.5 kDal y un componente menor que migra ligeramente más rápido. El mayor pico migró con la banda mayor de rHuEPO digerida con N-Glicanasa mientras que el pico menor migró con la banda más pequeña de rHuEPO. El mapeo de péptidos Lys-C en combinación con espectrometría de masas confirmó que el mayor pico corresponde a rHuEPO que contiene un carbohidrato O-unido mientras que el pico más pequeño corresponde a rHuEPO carente de un carbohidrato O-unido.

35 Los resultados de experimento representativo que analiza la ocupación de sitios-O para rHuEPO se presentan en la figura 4. La figura 4 muestra que la adición de manganeso 4 μM incrementó la ocupación de sitios-O de rHuEPO comparados con el control del 88.1 % al 91.6%.

40 Los resultados de experimentos representativos para darbepoetina se presentan en las figuras 5 y 6. La figura 5 muestra datos de cada ciclo de cosecha y demuestran que la adición de manganeso 4 μM incrementa la ocupación de sitios-O de darbepoetina comparada con el control del 76.8% al 86% después de la tercera cosecha. La figura 6 presenta datos del tercer ciclo de cosecha para darbepoetina y muestra como la ocupación de sitios-O se incrementó con concentraciones aumentadas de manganeso. Sin embargo, el manganeso 40 μM afectó negativamente los niveles de producción de proteína, resultando en una disminución relativa total del 17% en los mg de darbepoetina producida

sobre los tres ciclos de cosecha combinados. En contraste, el manganeso 10 µM no pareció afectar sustancialmente la producción de proteína.

Estos datos demuestran que la adición de Mn²⁺ al medio de cultivo incrementa la ocupación de sitios-O para eritropoyetina y darbepoyetina producidas en cultivos celulares CHO.

5 **Ejemplo 5:**

Evaluación de ramificación sitio-N y ocupación del sitio-N de rHuEPO

10 Para determinar la ramificación de sitios-N de rHuEPO o darbepoyetina producida de acuerdo con el ejemplo 1, las fracciones poco sialiladas se analizan por el contenido estructural mediante mapeo de N-glicano y secuenciación enzimática acoplada con espectrometría de masas MALDI-TOF para la determinación del tamaño. En resumen, el procedimiento requiere que los N-glicanos sean liberados enzimáticamente con 1 U/mL de N-Glicanasa (Sigma), luego desalificados y desproteinizados utilizando cromatografía PGC (VWR). Los N-glicanos libres son marcados en los términos reducidos con una etiqueta fluorescente de 2-aminobenzamida (2AB) mediante animación reductiva (Sigma).
 15 Un segundo procedimiento de limpieza es mejorado utilizando cromatografía de papel (VWR). Las mezclas de 2^{ABN}-glicano son mapeados sobre una columna Dionex PA1 con detección de fluorescencia (excitación 330 nm, emisión 420 nm) utilizando un gradiente isocrático de acetato de sodio de 50-150 mM a 1.67 mM/min con hidróxido de sodio (Sigma) a 50 mM. Las mezclas de 2^{ABN}-glicano son desialiladas utilizando 1 U/mL de neuraminidasa *A. ureafaciens* con y sin 0.5 U/mL de galactosidasa *B. testes*. Todas las digestiones se realizaron a 37 °C por 18h. El análisis del tamaño adicional de todas las mezclas de 2^{ABN}-glicano se obtienen por espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager, Applied BioSystems). La matriz se satura con ácido 2,5-dihidroxi benzoico en 70% de acetonitrilo, 0.05% de TFA (Sigma) y se mezcla en una relación 1:1 con la mezcla de 2^{ABN}-glicano en la prueba. Los ajustes de MALDI son de la siguiente manera: Voltaje de aceleración: 20,000 V; Tensión de red: 94 %; Alambre de guía: 0.05 %; Tiempo de retardo de Extracción: 75 nsec; Intensidad de láser: 2300; Rango de masa: 500-5000.

25 Para determinar la ocupación de N-unido de rHuEPO, 10 µg de un estándar de rHuEPO (Amgen Inc.) se digieren con 0.04 U de N-Glicanasa (Sigma) durante toda la noche a temperatura ambiente para dar una escalera de peso molecular de rHuEPO con variación de formas ocupadas de N-unido. 0.1 mg de rHuEPO total recolectados del medio de cosecha se cargan y se separan mediante SDS-PAGE (Novex, Invitrogen) y luego se transfieren a PVDF. Las transferencias son probadas con un anticuerpo monoclonal para rHuEPO.

Ejemplo 6:

Efecto de la suplementación de aminoácidos sobre la producción y glicosilación de rHuEPO

30 Para determinar el efecto de adición de aminoácidos en la producción de rHuEPO durante el cultivo celular, los niveles de todos los veinte aminoácidos fueron determinados mediante análisis de aminoácidos en el medio inicial ("medio standard" del ejemplo 1) y luego de nuevo después de cinco días de incubación en el tercer ciclo de cosecha como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Nueve aminoácidos específicos (no esenciales y esenciales) fueron agotados a bajos niveles (< 3mg/L) sobre este periodo de cultivo: cisteína, isoleucina, leucina, triptófano, valina, asparagina, ácido aspártico, glutamato, y glutamina.
 35

Las concentraciones de estos 8 aminoácidos en el medio estándar fueron duplicadas para crear un medio enriquecido. El medio enriquecido consistió de medio suplementado libre de suero 1:1 DMEM/F 12 con un stock de aminoácidos al 1% (2.25 g/L de asparagina; 1.99 g/L de ácido aspártico; 1.76 g/L de cisteína; 3.13 g/L de cistina; 2.21 g/L de ácido glutámico; 5.45 g/L de isoleucina; 5.91 g/L de leucina; 0.90 g/L de triptófano; y 5.29 g/L de valina). Las células fueron cultivadas en cualquier medio estándar o en medio enriquecido, el cual fue utilizado a través de todos los veintidós días del proceso de cultivo. Después del tercer ciclo de cosecha, el medio fue recolectado y rHuEPO en el medio cosechado fue cuantificado por HPLC fase reversa.
 40

Las células CHO cultivadas en medio enriquecido mostraron un modesto incremento del 12% en la producción de rHuEPO comparado a las células control cultivadas en medio estándar. Sin embargo, aunque el medio enriquecido mejoro la producción de rHuEPO, la cantidad de material poco sialilado fue incrementada dos veces, conduciendo a una disminución general en rHuEPO altamente sialilada comparada con los cultivos control.
 45

El cambio en la cantidad de rHuEPO encontrado en la mezcla poco sialilado fue debido a un grado inferior de sialilación de los carbohidratos individuales en lugar de un grado inferior de los carbohidratos ramificados. Las estructuras de carbohidratos unidos a N encontrados en rHuEPO en las fracciones poco sialiladas fueron analizados por MALDI-TOF.
 50 Los resultados se presentan posteriormente en la Tabla 1.

carbohidratos altamente ramificados (figura 7; estructuras M - T) fueron observadas. La suplementación de aminoácidos en el medio enriquecido resultó en una masa correspondiente a una estructura altamente ramificada en la cual hace falta la galactosa terminal (figura 7, estructura L). Masas similares de estructuras ramificadas carentes de galactosa fueron detectadas tanto en el control como en los medios enriquecidos (Figura 7, estructuras E, G, I, K, M-N, Q-R), Estos datos indican que el grado de ramificación en rHuEPO producida en medio estándar y medio enriquecido es similar y sugiere que la pérdida de residuos de ácido siálico quizás es debida a la disminución de galactosilación de carbohidratos N-unidos altamente ramificados.

Ejemplo 7:

Efectos invertidos de manganeso de suplementos de aminoácidos sobre la glicosilación

- 10 La rHuEPO fue cultivada de acuerdo con el ejemplo 1, en medio enriquecido solo o medio enriquecido más $MnCl_2$ 0.4, 4 y 40 μM . En los primeros puntos en el cultivo; cuando los números de células son bajos y la carga metabólica es mínima, el medio enriquecido no tiene efecto sobre la glicosilación de rHuEPO. Sin embargo, la restauración de estos líquidos agotados eventualmente causó defectos en ambas la ocupación de oligosacáridos y sialilación, después del tercer ciclo de cosecha.
- 15 Los resultados de diversos experimentos representativos se muestran en las figuras 9, 10 y 11. La figura 8 muestra que el cultivo de las células huésped en medio enriquecido (suplementado con aminoácidos) redujo el porcentaje de recuperación de rHuEPO altamente sialilado (43%, control vs. 29%, con suplementación de aminoácido.). La figura 8 también muestra que, adicionando el manganeso al medio enriquecido en 40, 4 y 0.4 μM mejoró el porcentaje de recuperación (31% en 40 μM , 42% en 4 μM , 41% en 0.4 μM).
- 20 La figura 9 muestra que el cultivo de las células huésped en medio enriquecido (suplementado con aminoácidos) incrementó el porcentaje de las formas obtenidas de rHuEPO poco sialilada (7.3% de control vs. 13%, con suplementación de aminoácido). La figura 9 también muestra que adicionando manganeso al medio enriquecido reduce en gran medida el porcentaje de rHuEPO poco sialilada producido en todas las concentraciones de Mn^{2+} (1.6% en 40 μM , 2.1 % en 4 μM , y 2.4% en 0.4 μM).
- 25 La figura 10 muestra que cultivando células huésped en medio enriquecido (suplementado con aminoácidos) reduce el porcentaje de ocupación de sitios-O por cadenas de azúcar (76.2% de control vs. 74.8% con suplementación de aminoácidos). La figura 10 también muestra que adicionando manganeso al medio enriquecido incrementó el porcentaje de ocupación de sitios-O (84.4% en 40 μM , 86.1% en 4 μM , 84.6% en 0.4 μM).
- 30 Mientras la calidad de rHuEPO fue claramente mejorada mediante la adición de Mn^{2+} 40 μM a los cultivos, el rendimiento de proteína rHuEPO secretada en el medio fue sustancialmente reducida en esta concentración de Mn^{2+} (a 36% del control en Mn^{2+} 40 μM). Los niveles de producción de proteína permanecieron altos cuando las concentraciones de Mn^{2+} 4 y 0.4 μM fueron adicionadas al medio enriquecido (109 y 114% de control, respectivamente).
- 35 Adicionalmente, la adición de Mn^{2+} resultó en masas consistente con los azúcares ramificados que contienen formas completamente galactosiladas. La digestión adicional con neuraminidasa más galactosidasa confirma estos resultados como masas fueron obtenidas consistentes con estructuras de núcleo ausentes de residuos de galactosa. Dentro de la mezcla de rHuEPO menos sialilado, la adición de Mn^{2+} resultó en estructuras predominantemente bianaténarias en donde el medio control y el medio enriquecido de aminoácidos contienen estructuras de N-Glicanos más ramificadas ausentes de galactosa terminal como se describió anteriormente. (figura 7; estructuras H, J, O, S).
- 40 Para descartar una posible limitación del nucleótido donador de azúcar UDP-Gal como una causa para galactosilación reducida cada condición fue también evaluada para cantidades relativas de UDP-Gal. Los datos muestran que los niveles de UDP-Gal en cada condición fueron estadísticamente indistinguibles y, por lo tanto, no causan galactosilación reducida observada con suplementación de aminoácidos en medio enriquecido. Tampoco fue la disponibilidad de UDP-Gal un factor en la mejora de galactosilación observada después de la adición de Mn^{2+} .
- 45 Así, el dato muestra que la adición de Mn^{2+} al medio enriquecido, en todas las concentraciones de Mn^{2+} , marcadamente redujo la fracción de rHuEPO poco sialilada producida y recuperaciones incrementadas de formas de rHuEPO altamente sialiladas. Se mostraron los efectos sobre sialización para incrementar con concentraciones crecientes de manganeso de una manera dependiente de la dosis. La adición de manganeso también mejoró la galactosilación de rHuEPO en la fracción poco sialilada, e incremento la ocupación del O-unido. El mejoramiento en la glicosilación fue independiente del nivel de la producción de rHuEPO. La evaluación de la ocupación del sitio-N mediante Western blot como se describe en el Ejemplo 5 también sugiere que la adición del Mn^{2+} mejora la ocupación del sitio-N.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Crowell, et al.

<120> Producción mejorada de Glicoproteínas Utilizando Manganeso

<130> 01017/41658A

<150> US 60/748,880

5 <151> 2005-12-08

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1725

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattccctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaag	tcccaggct	ccccagcagg	60
cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	120
ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	180
gccctaaact	ccgcccattc	cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgccccca	240
tggctgacta	atTTTTTTta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctcggcct	ctgagctatt	300
ccagaagtag	tgaggaggct	TTTTTggagg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	tggtcgagga	360
actgaaaaac	cagaaagtta	actggtaagt	ttagtctttt	tgtcttttat	ttcaggctccc	420
ggatccggtg	gtggtgcaaa	tcaaagaact	gctcctcagt	ggatgttgcc	tttacttcta	480
ggcctgtacg	gaagtgttac	ttctgctcta	aaagctgctg	caacaagctg	gtcgagatcc	540
taggtcacc	ggcgcgcccc	aggtcgtga	gggacccccg	ccaggcgcgg	agatgggggt	600
gcacgaatgt	cctgcctggc	tgtggettct	cctgtccctg	ctgtcgtctc	ctctgggcct	660
cccagtccctg	ggcgcccccac	cacgcctcat	ctgtgacagc	cgagtccctgg	agaggtacct	720
cttgagggcc	aaggaggccg	agaatatcac	gacgggctgt	aatgaaacgt	gcagcttgaa	780
tgagaatata	actgtcccag	acaccaaagt	taatttctat	gcctggaaga	ggatggaggt	840
cgggcagcag	gccgtagaag	tctggcaggg	cctggccctg	ctgtcgggaag	ctgtcctgcg	900
gggccaggcc	ctgttggtca	actcttccca	gggtaatgag	accctgcagc	tgcattgtgga	960
taaagccgtc	agtggccttc	gcagcctcac	cactctgctt	cgggctctgg	gagcccagaa	1020
ggaagccatc	tcccctccag	atgcggcctc	agctgctcca	ctccgaacaa	tcaactgctga	1080
cactttccgc	aaactcttcc	gagtctactc	caatttccctc	cggggaaagc	tgaagctgta	1140
cacaggggag	gcctgcagga	caggggacag	atgaccaggt	gtgtccacct	gggdatatcc	1200
accacctccc	tcaccaacat	tgettgtgcc	acaccctccc	ccgccaactcc	tgaaccccg	1260
cgaggggctc	tcagctcagc	gccagcctgt	cccatggaca	ctccagtgcc	agcaatgaca	1320
tctcaggggc	cagaggaact	gtccagagag	caactctgag	atctcgacca	tgggaaatgt	1380
cagagtggag	aaccacaccg	agtgcactg	cagcacttgt	tattatcaca	aatcctaata	1440
gtttgcagtg	ggccttgctg	atgatggctg	acttgctcaa	aaggaaaatt	aatttgtcca	1500
gtgtctatgg	ctttgtgaga	taaaaccctc	cttttccctg	ccataccatt	tttaacctgc	1560
tttgagaata	tactgcagct	ttattgcttt	tctccttctc	ctacaatata	atcagtagtc	1620
ttgatctttt	catttggaa	gaaatatggc	atttagcatg	accataaaaa	gctgattcca	1680
ctggaaataa	agtcttttaa	atcatcactc	tatcactgaa	ttcta		1725

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> mat_péptido

<222> (28)..(192)

<400> 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu Thr Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Val Asn Glu Thr Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

<210> 3

<211> 193

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_ péptido

<222> (28)..(192)

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de una composición eritropoyética que comprende glicoproteínas estimulantes de eritropoyesis sialilada, que comprende las etapas de: crecimiento de una célula huésped CHO sensible al manganeso que produce una glicoproteína estimulante de eritropoyesis en un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de manganeso para aumentar la sialilación de dicha composición eritropoyética producida por dicha célula huésped sensible al manganeso, en donde la concentración de manganeso en dicho medio de cultivo varía desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 μM , y en donde las glicoproteínas estimulantes de eritropoyesis comprenden:
 - a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (eritropoyetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma; o
 - 10 (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (darbepoetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de recuperación de una composición eritropoyética en donde menos de aproximadamente 5% de las moléculas estimulantes de eritropoyesis son poco sialiladas.
3. El método de la reivindicación 1 en el cual la cantidad de manganeso es eficaz para aumentar el porcentaje de moléculas estimulantes de eritropoyesis altamente sialiladas.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad de manganeso es eficaz para aumentar el porcentaje de moléculas estimulantes de eritropoyesis que son glicosiladas en sitios potenciales de glicosilación 0-unidos
5. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad de manganeso es eficaz para incrementar el porcentaje de galactosa entre los azúcares unidos a moléculas estimulantes de eritropoyesis.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el medio de cultivo es esencialmente libre de suero.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el manganeso está en una concentración desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 μM .
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el manganeso está en una concentración desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 4 μM .
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el medio de cultivo comprende además uno o más aminoácidos suplementarios seleccionados del grupo consiste en asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, isoleucina, leucina, triptófano, o valina.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las células huéspedes son cultivadas en botellas giratorias.
- 30 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el manganeso se adiciona después de una fase de rápido crecimiento celular.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la fase de rápido crecimiento celular dura por un periodo que oscila entre aproximadamente 2 y 20 días.
13. El método de la reivindicación 12, en donde en el cual el manganeso se adiciona después de dos ciclos de cosecha.
- 35 14. El método de la reivindicación 13, en donde el primer ciclo de cosecha es aproximadamente 8 días y el segundo ciclo de la cosecha es aproximadamente 7 días de duración.
15. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de la recuperación de la composición eritropoyética la cual comprende dichas glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis sialiladas a partir de las células huésped y el medio de cultivo.
- 40 16. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de recuperación de la composición eritropoyética la cual comprende glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis altamente sialiladas a partir de las células huésped y el medio de cultivo.
17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde dicha recuperación comprende la separación de moléculas estimulantes de eritropoyesis altamente sialiladas y moléculas estimulantes de eritropoyesis no sialiladas.

18. El método de la reivindicación 17. en donde dicha separación es realizada mediante cromatografía de intercambio aniónica.

5 19. Un medio de cultivo que comprende células huésped CHO que produce glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis y manganeso en una concentración desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 μM , en donde las glicoproteínas estimulantes de la eritropoyesis comprenden:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (eritropoyetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma;

(b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (darbepoetina) o fragmentos eritropoyéticos de la misma.

20. El medio de cultivo de reivindicación 19, en donde las células huéspedes secretan una composición eritropoyética.

10 21. El medio de cultivo de reivindicación 19, en donde el manganeso está en una concentración desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 μM .

Figura 1

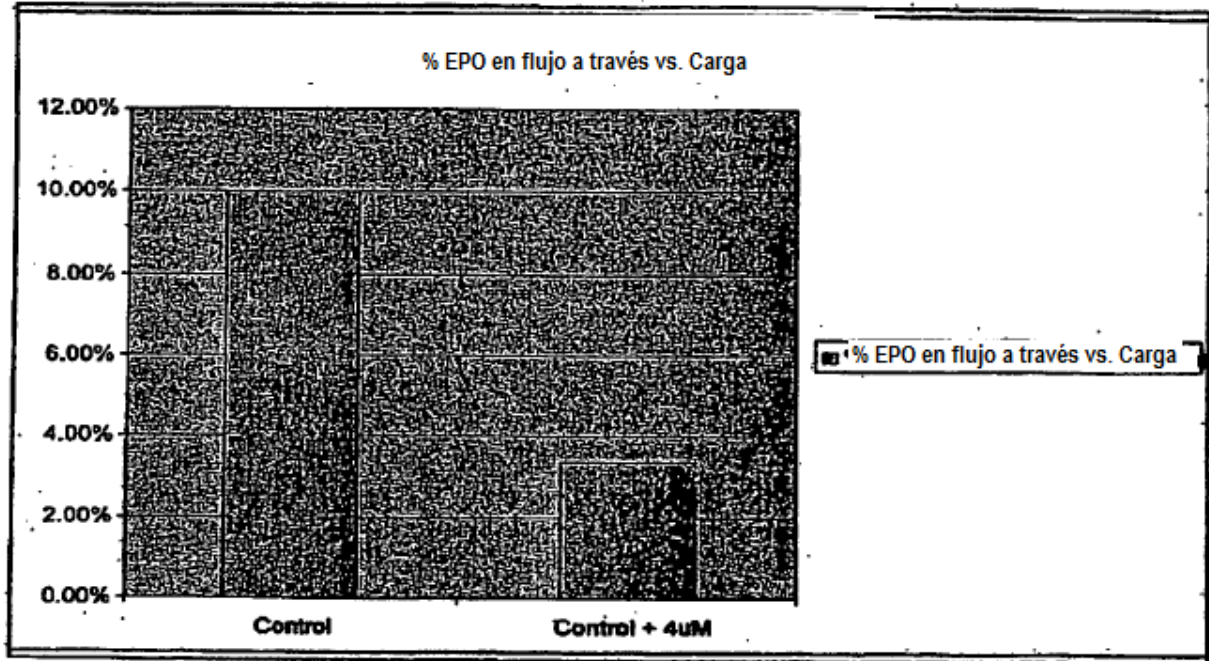


Figura 2

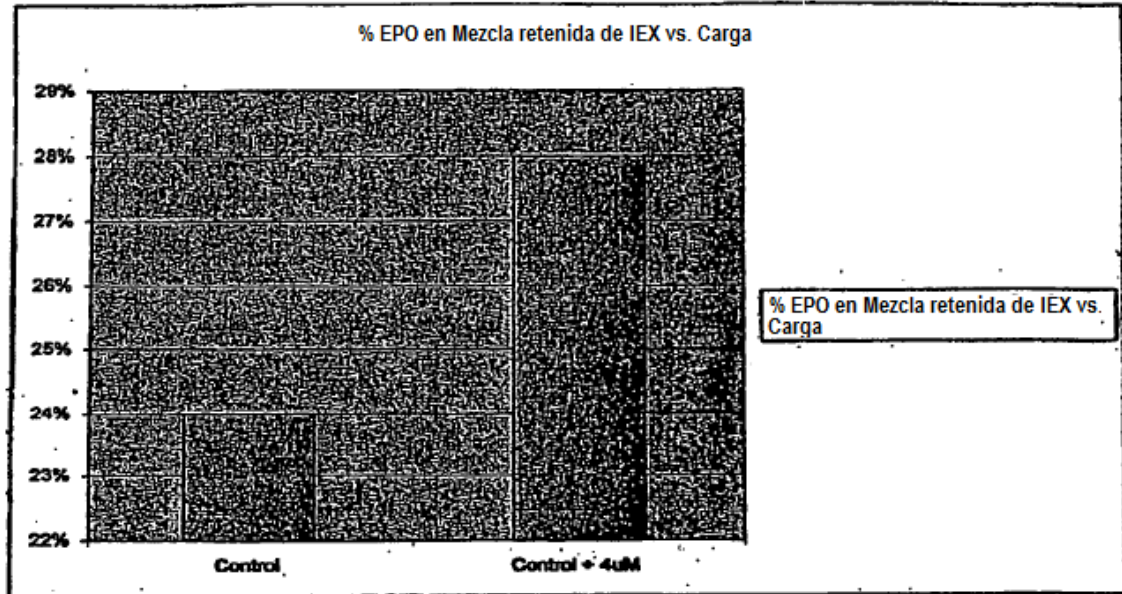


Figura 3

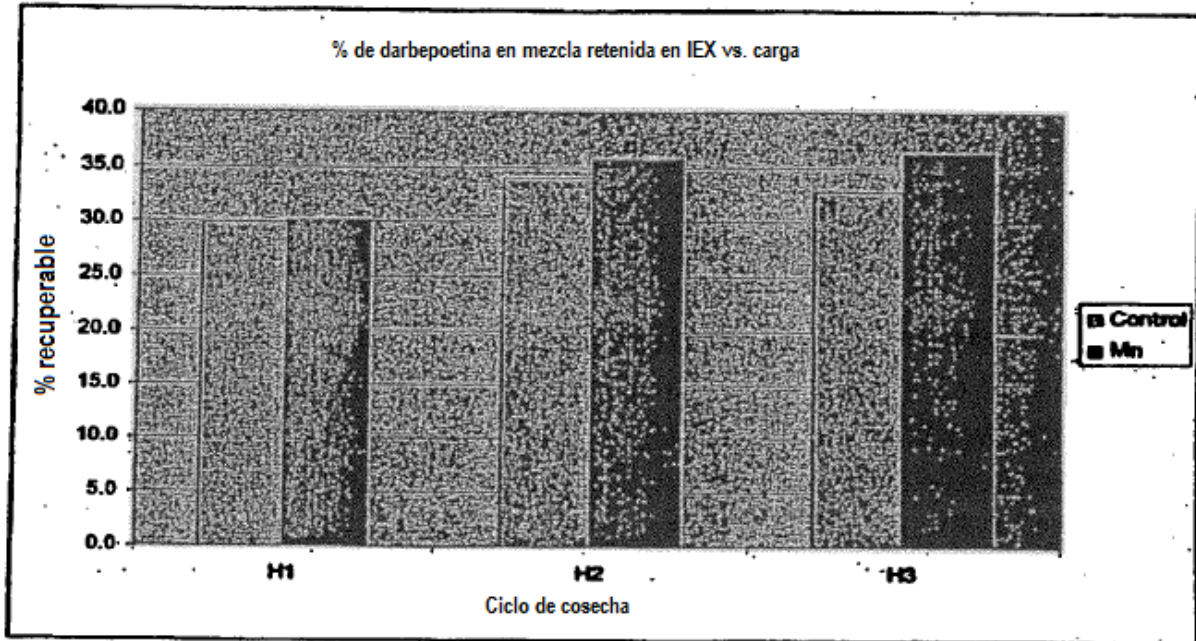


Figura 4

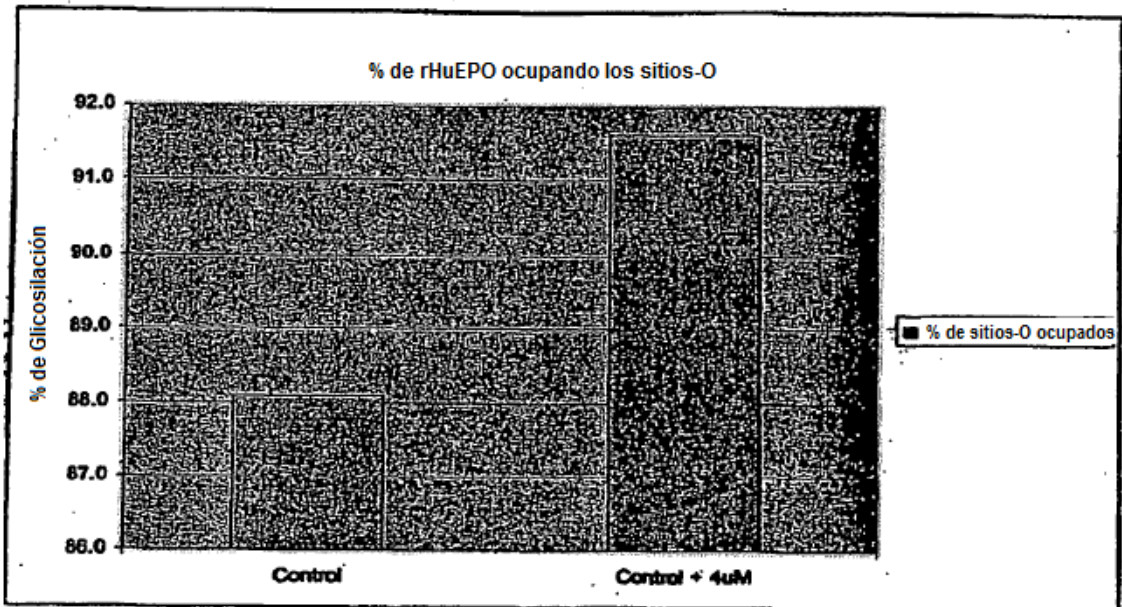


Figura 5

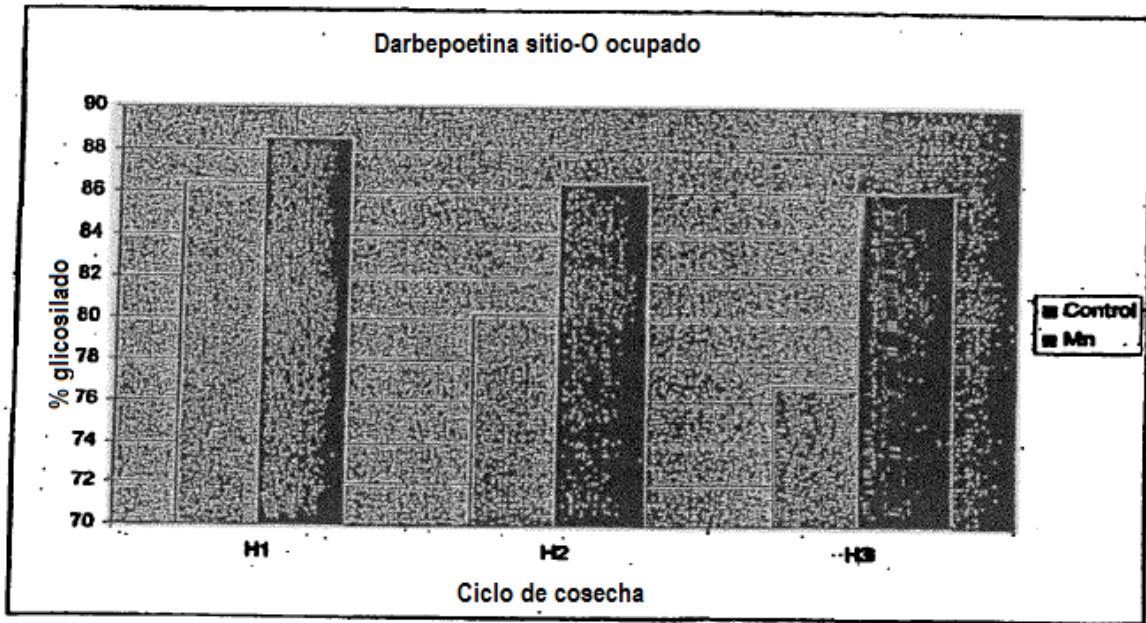


Figura 6

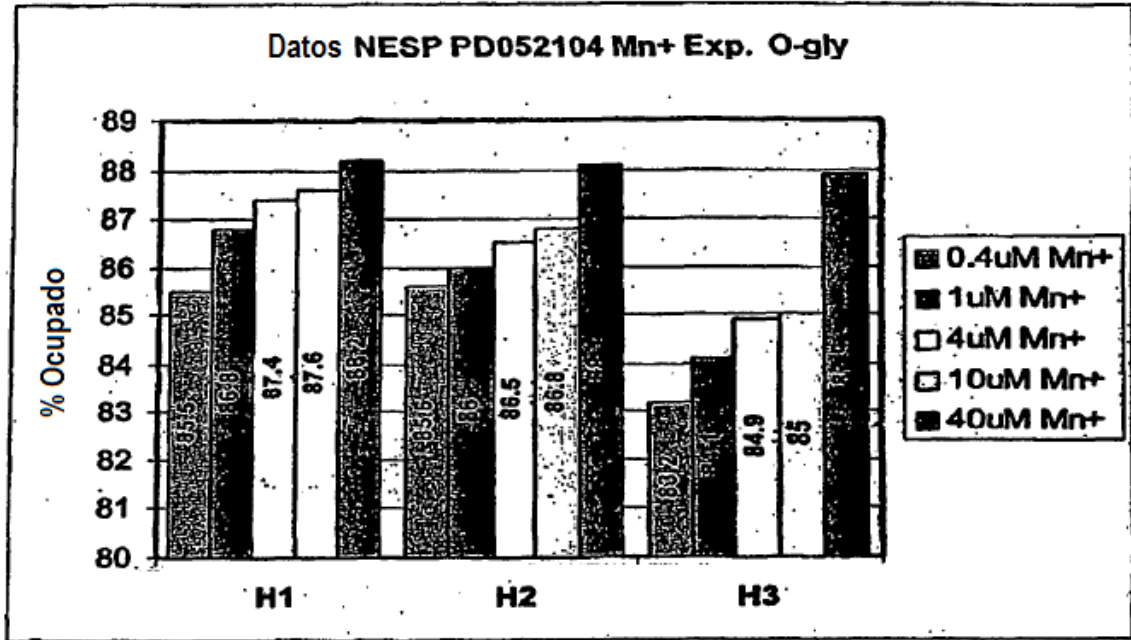


Figura 7

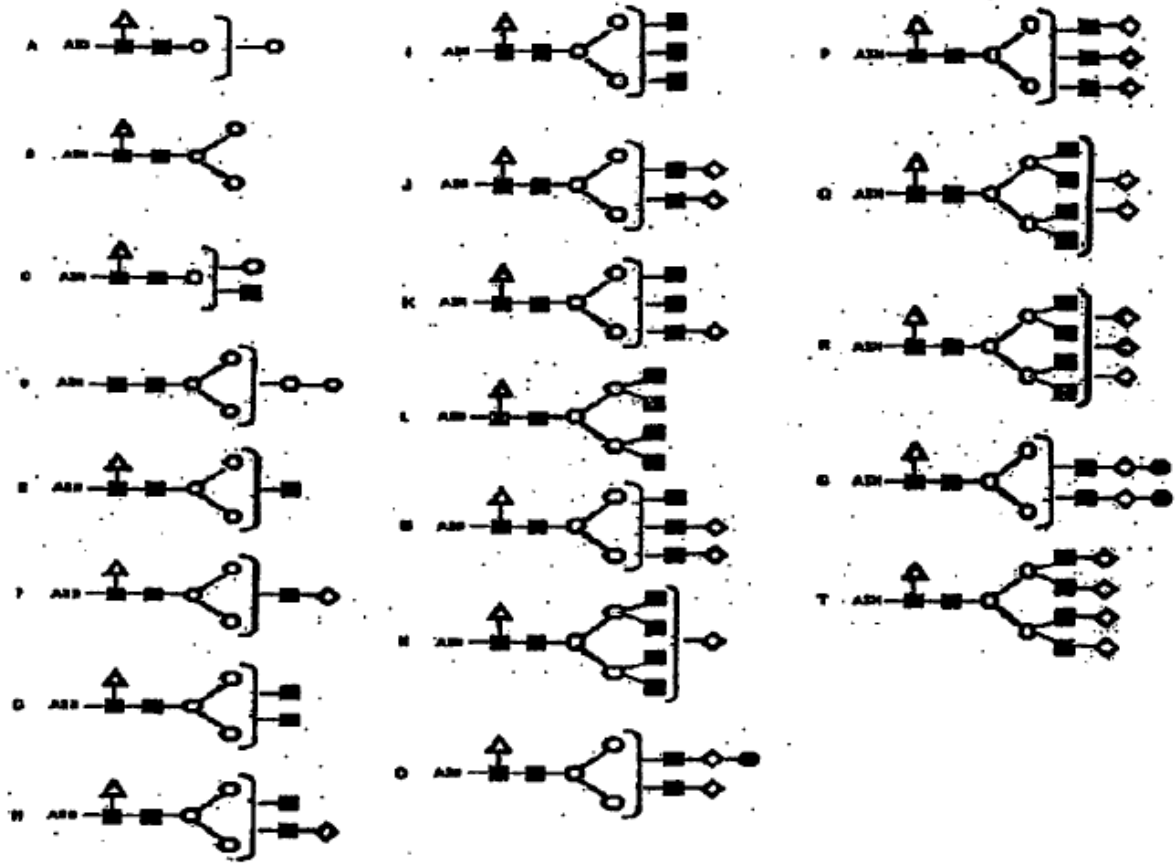


Figura 8

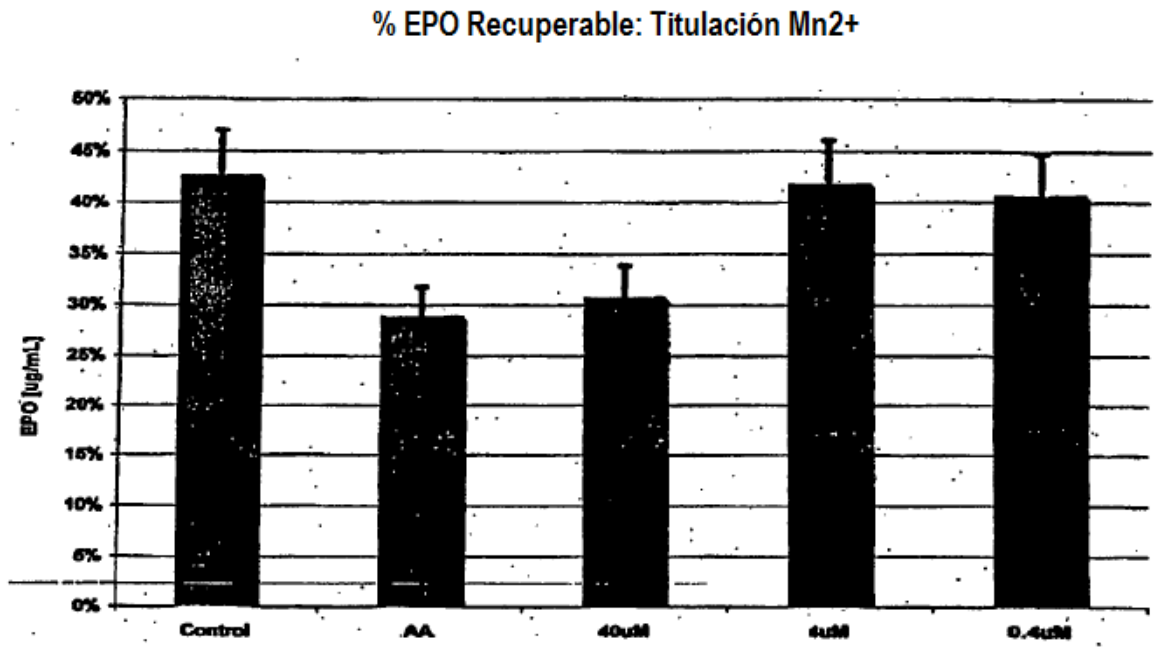


Figura 9

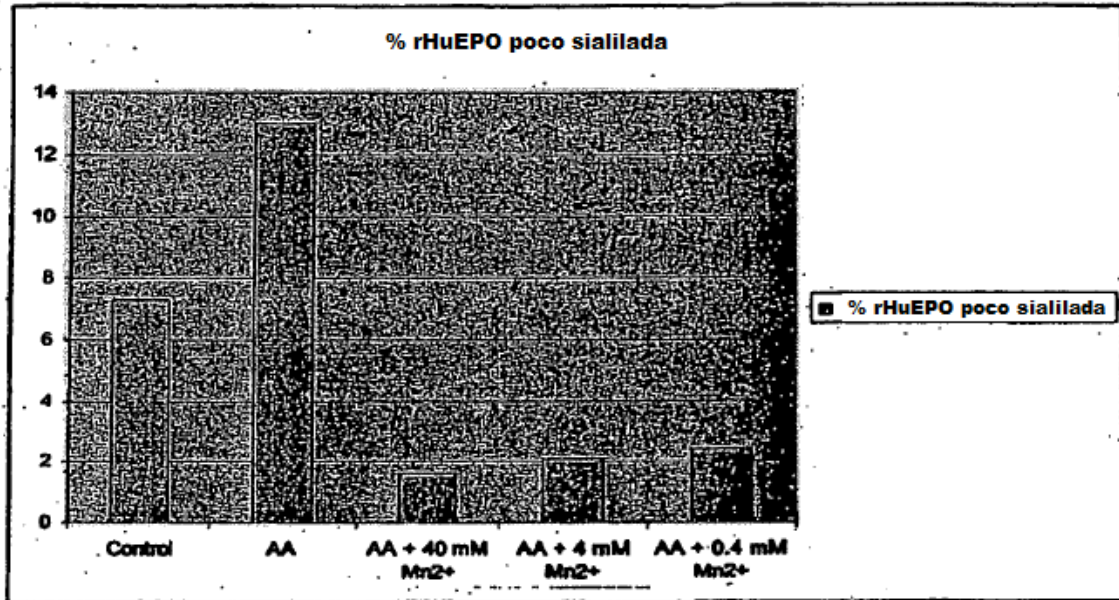


Figura 10

