

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 003**

51 Int. Cl.:

<b>C12P 21/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/38</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)
<b>C07K 16/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2015 PCT/EP2015/053804**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2015 E 15709430 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3110961**

54 Título: **Modulación del crecimiento celular y glucosilación en la producción de glucoproteínas recombinantes**

30 Prioridad:  
**27.02.2014 EP 14157030**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2020**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**POPP, OLIVER;  
BEAUCAMP, NICOLA;  
DRABNER, GEORG y  
ESSLINGER, STEPHANIE**

74 Agente/Representante:  
**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 769 003 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

Modulación del crecimiento celular y glucosilación en la producción de glucoproteínas recombinantes

- 5 La presente solicitud se refiere al papel que desempeñan los oligoelementos en el crecimiento celular y la glucosilación de proteínas en la producción por fermentación de glucoproteínas recombinantes.

ANTECEDENTES

- 10 Las glucoproteínas recombinantes se producen típicamente por un procedimiento de producción fermentativo usando sistemas de expresión eucariotas. La glucosilación postraduccional de proteínas es esencial para cumplir importantes propiedades y funciones fisicoquímicas y biológicas, tales como solubilidad, estabilidad, aclaramiento, inmunogenicidad y funciones efectoras inmunitarias de las proteínas. El estado de glucosilación de una glucoproteína se regula estrictamente e incluso pequeñas diferencias en la glucosilación pueden tener efectos significativos. Sin embargo, debido al gran número de enzimas implicadas, en particular en la N-glucosilación, la vía es la modificación postraduccional más compleja realizada en células eucariotas. En glucoproteínas, los glúcidos se unen al átomo de nitrógeno de la amida en la cadena lateral de asparagina (un enlace N) o bien al átomo de oxígeno en la cadena lateral de serina o treonina (un enlace O). La glucosilación comienza con la formación de los enlaces N en el retículo endoplásmico, la llamada "glucosilación central". Después de esto, los polipéptidos se transportan al aparato de Golgi donde se añaden los glúcidos unidos a O y se modifican las cadenas glucídicas unidas a N de muchas formas diferentes, por ejemplo por la retirada de residuos de manosa, adición de residuos de N-acetilglucosamina, galactosa y/o fucosa y/o ácido siálico.

- 25 Los metales y sus iones desempeñan papeles esenciales en biología (Yannone *et al.*, Current Opinion in Biotechnology **23.1** (2013) 89-95). Se ha informado de que, de 39 elementos biológicos esenciales, 26 son metales. Además, existe una variación significativa en las concentraciones activas de estos metales requeridas para cumplir con su función biológica. Los metales esenciales se pueden clasificar en macronutrientes, como calcio, potasio o magnesio, y micronutrientes como los oligoelementos metálicos hierro, cinc, manganeso o cobre, y ultraoligoelementos, como vanadio y wolframio. Aunque estos metales esenciales son críticos para la homeostasis biológica, pueden ser tóxicos en concentraciones más allá de las necesarias para su función biológica. Por tanto, una regulación estricta de la concentración de metal sistémica es vital para la homeostasis biológica.

- 35 Los metales de transición cobre, hierro, cinc y manganeso se clasifican de acuerdo con su concentración activa biológica como oligoelementos y tienen un papel clave en la homeostasis celular. Se encuentran en sitios activos de muchas enzimas como se describe en Fraga y Fraga (Mol. Aspects Med. **26.4-5** (2005) 235-44).

- 40 Desde hace muchos años, se ha estudiado el papel de los oligoelementos en el crecimiento celular usando experimentos de alimentación animal y cultivo celular. Se ha demostrado que esos oligoelementos son necesarios para un cultivo celular con éxito por Ham *et al* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA **53** (1965) 288-93). También existe mucho interés en el papel de los oligoelementos en la glucosilación de proteínas, pero las contribuciones enzimáticas detalladas de distintos oligoelementos y las interacciones de los cationes metálicos en la vía de glucosilación siguen siendo relativamente desconocidas.

- 45 En general, la actividad de las enzimas de glucosilación depende de la disponibilidad de oligoelementos divalentes (tales como Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), el pH del medio y la disponibilidad de fosfatos nucleótidos (UTP, GTP, CTP) y los correspondientes derivados glucídicos (UDP-Gal, UDP-GlcNAc, GDP-Fuc, CMP-ácido siálico).

- 50 Kaminska *et al.*, (Glyconj. J. **15.8** (1998) 783-88) estudiaron el papel de cationes divalentes en la actividad de la glucoproteína 6- $\alpha$ -L-fucosiltransferasa y descubrieron que, mientras los cationes divalentes tales como Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> activaron esta enzima, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> inhibieron fuertemente la actividad de esta enzima. Witsell *et al.*, (J. Biol. Chem. **265.26** (1990) 15731-37) describen el papel de cationes divalentes particulares en la activación de galactosiltransferasa en vesículas de Golgi mamarias naturales. Crowell *et al.*, (Biotechnol. Bioeng. **96.3** (2007) 538-49) describen que los oligoelementos, en especial manganeso, interactúan con otros factores de cultivo, como disponibilidad aminoacídica, en fases tardías del procedimiento con cultivos extremos para regular la glucosilación de proteínas. Gawlitzeck *et al.*, (Biotechnol. Bioeng. **103.6** (2009) 1164-75) observan que las condiciones de cultivo celular, tales como concentraciones de manganeso y hierro, el butirato potenciador de productividad específico, hormonas tiroideas y pH del cultivo pueden controlar la ocupación del sitio de N-glucosilación de glucoproteínas recombinantes expresadas en células CHO.

- 60 Como se explica en el documento US 2007/0161084, varias enzimas implicadas en la glucosilación utilizan diferentes cationes como cofactores. En esa solicitud, los inventores descubrieron que la sialilación de glucoproteínas, es decir, la adición de un residuo de ácido siálico terminal a una cadena de hidratos de carbono en una glucoproteína, y en particular la sialilación de eritropoyetina, se podría mejorar cultivando las células huésped de mamífero que expresan la glucoproteína en un medio que contiene una cantidad no tóxica de manganeso. El manganeso puede estar presente en el medio de crecimiento inicial o se puede añadir después de una fase de crecimiento celular rápido o se puede añadir después de uno o dos ciclos de obtención.

El papel del manganeso y su concentración activa en el crecimiento celular es controvertido. Se ha informado de que el manganeso es esencial para el crecimiento y desarrollo celular normal, pero simultáneamente es tóxico a altas concentraciones (Au *et al.*, *Neurotoxicology* **29.4** (2008) 569-76). Por ejemplo, se ha demostrado que el manganeso se une a las integrinas localizadas en la superficie celular y activa las MAP cinasas, ERK1 y 2, ambas interruptores importantes para el crecimiento celular (Roth *et al.*, *Neurotoxicology* **23.2** (2002) 147-57). Por otra parte, Roth *et al.*, también muestran que el manganeso está implicado en la muerte celular y apoptosis de células activando muchos factores apoptóticos, que finalmente dan lugar a muerte celular por inactivación de la función mitocondrial e induciendo la pérdida de ATP. El efecto tóxico del manganeso es bastante fuerte cuando se retira el hierro del medio de cultivo celular, puesto que hierro y manganeso compiten por la misma lanzadera de membrana celular DMT1 (Roth *et al.*).

El documento US 2008/0081356 describe un procedimiento para producción a gran escala de glucoproteínas con alteración en los patrones de glucosilación en cultivo celular a escala comercial usando un medio que contiene una concentración acumulativa molar de manganeso de entre 10 y 600 nM y una concentración de glutamina acumulativa molar de menos de aproximadamente 8 mM.

El documento WO 2012/149197 describe procedimientos para modular el perfil de galactosilación de proteínas expresadas de forma recombinante, y en particular anticuerpos, en líneas celulares CHO y NSO complementando los medios de producción con manganeso y/o galactosa.

La importancia de Mn<sup>2+</sup> como cofactor para la actividad de β-1,4-galactosil-transferasa se ha descrito previamente por Ramakrishnan *et al.*, (*J. Mol. Biol.* **357.5** (2006) 1619-33).

Se ha informado de que el cinc es esencial para la proliferación y diferenciación celular, en especial para la regulación de la síntesis de ADN y la mitosis. El cinc es un componente estructural de una gran cantidad de proteínas, incluyendo factores de transcripción y enzimas de las vías de señalización celular, tales como las actividades del metabolismo del segundo mensajero, proteína cinasa y proteínas fosfatasa (Beyersmann *et al.*, *Biometals* **14.3-4** (2001) 331-41). En consecuencia, el cinc biodisponible se ha asociado con la proliferación celular.

El hierro tiene un papel clave en la regulación del crecimiento celular. Se ha informado previamente de que la complementación de hierro, o su proteína de transporte transferrina, en un medio de cultivo celular químicamente definido es vital para la generación de biomasa. Por ejemplo, se ha demostrado que el hierro promueve el crecimiento celular del glioma C6 y las líneas celulares cancerosas leucémicas L1210 en medio libre de suero (Basset *et al.*, *Carcinogenesis* **6.3** (1985) 355-59). El papel fundamental del hierro en el crecimiento celular se demuestra además por los quelantes que pueden atravesar la membrana plasmática, limitando su biodisponibilidad por la unión del metal dentro de la célula. Los agentes tales como desferrioxamina y desferritiocina inhiben el crecimiento de una variedad de células tumorales en cultivo (Reddel *et al.*, *Exp.Cell Res.* **161.2** (1985) 277-84 y Basset *et al.*, *supra*) y reducen en gran medida la proliferación de linfocitos T (Polson *et al.*, *Immunology* **71.2** (1990) 176-81 y Pattanapanyasat *et al.*, *Br. J. Haematol.* **82.1** (1992) 13-19). Aquí, el posible mecanismo inhibitor del crecimiento celular es la privación de hierro, asociada con una reducción en la actividad de ribonucleótido reductasa y una reducción en la cantidad de desoxirribonucleótidos. Esto da lugar posteriormente a una detención mitótica en la fase S. La adición de hierro al medio invierte la inhibición del crecimiento (Lederman *et al.*, *Blood* **64.3** (1984) 748-53).

El documento WO 98/08934 describe el uso de un medio complementado con cinc y hierro (entre otros componentes) en cultivo en suspensión para soportar el crecimiento de alta densidad de células de mamífero.

El cobre desempeña un papel esencial en la homeostasis celular, aunque los destinos metabólicos de cobre y hierro están estrechamente relacionados (Arredondo *et al.*, *Molecular Aspects of Medicine* **26.4** (2005) 313-27). La carencia de cobre sistémica genera carencia de hierro celular, lo que provoca efectos fenotípicamente similares como disminución en el crecimiento celular. Además, la reducción de biodisponibilidad por quelación de cobre se ha asociado con una reducción en la capacidad de fosforilación del receptor estimulada por el factor de crecimiento y finalmente inhibición de las vías de proliferación celular en estudios de cultivo celular (Turski *et al.*, *J. Biol. Chem.* **284.4** (2009) 717-21). Por otra parte, se ha demostrado que el cobre estimula la formación de vasos sanguíneos y la privación de cobre por la dieta o los quelantes de cobre disminuye la capacidad de un tumor para soportar una respuesta angiogénica (Harris *et al.*, *Nutr. Rev.* **62.2** (2004) 60-64) y neoplasia (Gupte *et al.*, *Cancer Treat. Rev.* **35.1** (2009) 32-46).

El documento US 2009/0068705 describe procedimientos para la producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivo celular donde el medio de cultivo comprende cobre y/o glutamato y con lo que el polipéptido tiene un patrón de glucosilación más extenso o más deseable.

Aunque el trabajo en esta área se ha centrado en la actividad de los cofactores metálicos en la estimulación de glucoenzimas, diversos autores, tales como Kaminska *et al.*, *supra*, también han demostrado que los mismos o diferentes cofactores metálicos pueden inhibir la actividad de otra glucoenzima (por ejemplo, el Ca<sup>2+</sup> activa el

manosil-oligosacárido 1,2- $\alpha$ -manosidasa e inhibe simultáneamente la  $\alpha$ -1,3-manosil-glicoproteína 2- $\beta$ -N-acetilglucosaminil-transferasa). La información sobre cofactores metálicos *in vitro* requeridos para la activación, o para disposiciones estructurales de la proteína, y los inhibidores metálicos de varias enzimas implicadas en la glucosilación se puede obtener de la base de datos BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>). Esta actividad doble de diversos cofactores metálicos destaca la necesidad de una regulación estricta del uso de oligoelementos en la producción de glicoproteínas.

Se ha demostrado que la glucomanipulación, es decir, el cambio de hidratos de carbono asociados a proteína por coexpresión recombinante de glucoenzimas endógenas o heterólogas, afecta a las propiedades farmacocinéticas de las proteínas, tales como estabilidad molecular, solubilidad, actividad biológica *in vivo* e inmunogenicidad. En los anticuerpos en particular, se ha demostrado que el incremento en la cantidad de galactosilación afecta a las funciones efectoras del anticuerpo, tales como la CDC (Raju, Curr. Opin. Immunol. **20.4** (2008) 471-8) o la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, galactosilación de anti-D monoclonal de IgG humana afecta a la actividad funcional mediada por el receptor de Fc (Kumpel *et al.*, Hum. Antib. Hyb. **5.3-4** (1994) 143-51); o se ha demostrado que un incremento en la cantidad de galactosilación potencia el bloqueo de inflamación mediada por el complemento por complejos inmunitarios de IgG (Karsten *et al.*, Nat. Med. **18.9** (2012) 1401-6). La N-glicosilación de regiones Fc del anticuerpo es esencial para la unión a los receptores Fc, que comprometen las funciones efectoras del anticuerpo. La fucosa es un residuo central en los N-glicanos de muchos anticuerpos, pero se ha demostrado que las formas no fucosiladas tienen una potenciación en la ADCC sobre sus homólogos fucosilados. Los procedimientos para incrementar la producción de proteínas no fucosiladas y/o influir en la fucosilación de anticuerpos, por tanto, también son deseables.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad en la técnica de obtener procedimientos para potenciar estrategias de cultivo celular, incluyendo mejorar el crecimiento celular y la generación de biomasa y/o dirigir la glucosilación y, por lo tanto, la maduración de las glicoproteínas.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la invención han determinado el papel de oligoelementos bioactivos en el rendimiento del cultivo celular y, en particular, en el crecimiento celular y la formación de glicano en las glicoproteínas y, por lo tanto, en la maduración de las glicoproteínas. En consecuencia, la presente invención se refiere a procedimientos para seleccionar entre condiciones que afectan al crecimiento celular o la generación de biomasa y condiciones que afectan a la madurez de N-glicano en la glicoproteína expresada producida por las células. Por tanto, en los procedimientos de la presente invención, las células productoras de glicoproteína se cultivan en un medio que se adapta a un resultado final deseado. La invención se define por las reivindicaciones.

Se describe un procedimiento para la producción de una glicoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota, comprendiendo el procedimiento ajustar las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo durante el cultivo para afectar a la generación de biomasa y/o madurez de N-glicano en la glicoproteína expresada.

El procedimiento engloba ajustar las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso para afectar a la generación de biomasa y/o madurez de N-glicano de la glicoproteína expresada. El ajuste de las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso querrá decir que las condiciones en la célula favorecerán la generación de biomasa o tendrán un efecto sobre la madurez de la glicoproteína expresada. Por "favorecer", como se usa en el presente documento, se quiere decir que la actividad de la célula estará en la dirección establecida en comparación con una célula cultivada en las mismas condiciones pero en la que las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso no se han ajustado de esta manera. Por tanto, cuando se favorece la generación de biomasa, la célula se dirigirá más hacia la multiplicación que hacia la producción de glicoproteína. En consecuencia, existirá una potenciación o incremento en la generación de biomasa. Asimismo, cuando el ajuste de las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, afecta a la madurez de N-glicano de la glicoproteína expresada, la célula se dirigirá más hacia la producción de dichas glicoproteínas que hacia, por ejemplo, la generación de biomasa o producción de otros tipos de glicoproteínas. Por tanto, la producción del tipo de glicoproteína deseado se potenciará o se incrementará.

Los procedimientos afectan a la madurez de N-glicano de la glicoproteína expresada, por ejemplo, para dar como resultado la producción de una glicoproteína con un nivel de madurez deseado. Por tanto, los procedimientos afectan a la producción de glicoproteínas N-glicosiladas maduras y/o glicoproteínas N-glicosiladas inmaduras, glicoproteínas no fucosiladas maduras y/o glicoproteínas no fucosiladas inmaduras. Los procedimientos incluyen incrementar la madurez de glicoproteínas N-glicosiladas expresadas, incrementar la producción de glicoproteínas N-glicosiladas maduras, incrementar la producción de glicoproteínas no fucosiladas maduras y/o incrementar la producción de glicoproteínas no fucosiladas inmaduras. Concomitante con el incremento en la producción de glicoproteínas N-glicosiladas maduras puede existir una disminución en la producción de especies de glicoproteínas no fucosiladas maduras y/o inmaduras y glicoproteínas N-glicosiladas inmaduras. Concomitante con el incremento en la producción de glicoproteínas no fucosiladas inmaduras puede existir una disminución en la producción de glicoproteínas no fucosiladas maduras y/o glicoproteínas N-glicosiladas maduras o inmaduras.

5 En determinados casos, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se pueden ajustar en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa, es decir, para potenciar el crecimiento de las células y de este modo, incrementar la biomasa. En otros casos, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se pueden  
 10 ajustar en el medio de cultivo para incrementar la madurez de la glucoproteína expresada, en las que la porción de hidratos de carbono de la glucoproteína expresada tiene una estructura G0, G1 o G2. En un caso, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, se pueden ajustar en el medio de cultivo para favorecer, es decir, incrementar la producción de glucoproteínas N-glucosiladas maduras. En otro caso, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se pueden ajustar para favorecer, es decir, incrementar la  
 15 producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. Aún en otro caso, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo se pueden ajustar en primer lugar para potenciar el crecimiento y de este modo, incrementar la biomasa y a continuación de nuevo para afectar a la madurez de las glucoproteínas, ya sea incrementando la madurez en las glucoproteínas expresadas, incrementando la producción de glucoproteínas N-glucosiladas maduras o incrementando la producción de glucoproteínas no fucosiladas maduras o inmaduras.

Por tanto, la invención implica:

- 20 - favorecer la generación de biomasa incrementando la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo;
- favorecer el incremento en la madurez en las glucoproteínas N-glucosiladas expresadas incrementando la concentración de cada uno de cinc y manganeso y, opcionalmente, reduciendo la concentración de hierro y cobre en el medio de cultivo; y
- 25 - favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras (i) disminuyendo las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo, o bien (ii) incrementando las concentraciones de cada uno de cobre y hierro y disminuyendo la concentración de cada uno de cinc y manganeso en el medio de cultivo.

30 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que para favorecer la generación de biomasa, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan en el medio de cultivo a:

- 35 - (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;
- (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;
- (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- 40 - (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .

En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que para favorecer el incremento en la madurez en las glucoproteínas N-glucosiladas expresadas, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso [en (i)] o las concentraciones de cinc y manganeso [en (ii)], se ajustan en el medio de cultivo a:

- 45 (i)
- (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ;
- (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ ;
- 50 - (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ ; o

- 55 (ii)
- (a) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- (b) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .

60 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que para favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan en el medio de cultivo a:

- 65 (i)

- (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 35  $\mu\text{M}$ ;
  - (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ;
  - 5 - (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y
  - (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ ; o bien
  - (ii)
  - 10 - (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;
  - (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;
  - 15 - (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y
  - (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ .
- 20 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que la glucoproteína es exógena o endógena a la célula eucariota, opcionalmente en los que la glucoproteína es una glucoproteína estructural, hormona, anticuerpo o enzima.
- 25 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que la glucoproteína es un anticuerpo, opcionalmente en los que el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico o diagnóstico, opcionalmente un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
- 30 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que la célula eucariota es una célula de mamífero, una célula de levadura o una célula de insecto.
- 35 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan durante las fases de cultivo de crecimiento y/o producción.
- 40 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente, en los que se logra un incremento en la concentración de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo complementando el medio en el que se cultivan las células con cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso y/o dividiendo las células en un medio recién preparado complementado con cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso.
- 45 En la invención, se logra cualquier disminución en la concentración biodisponible de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo complejando el hierro, cobre, cinc y manganeso con un quelante y/o sembrando las células en un medio recién preparado que contiene una reducción en la concentración de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en comparación con el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente.
- 50 En un aspecto, la invención incluye procedimientos como se describe anteriormente en los que las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo se ajustan durante el cultivo en primer lugar para favorecer la generación de biomasa y a continuación para favorecer la producción de glucoproteínas N-glucosiladas maduras o bien la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras.
- 55 También se describe un medio adecuado para la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota, comprendiendo el medio una concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso para favorecer la generación de biomasa y/o afectar a la madurez de N-glucano de la glucoproteína expresada.
- 60 En un caso, el medio comprende concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso de:
- (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;
  - (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;
  - (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
  - (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .
- 65 El uso de un medio de este tipo en la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota favorece la generación de biomasa.

En un caso, el medio comprende concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso, o de cinc y manganeso, de:

(i)

5

- (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ;

- (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ ;

10 - (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y

- (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ ; o

(ii)

15

- (a) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y

- (b) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .

20 El uso de un medio que comprende concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso o de cinc y manganeso de (i) o (ii) respectivamente, en la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota favorece un incremento en la madurez en glucoproteínas N-glucosiladas expresadas.

25 En un caso, el medio comprende concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso de:

(i)

30

- (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 35  $\mu\text{M}$ ;

- (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ;

- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y

35 - (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ ; o bien

(ii)

40

- (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;

- (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;

- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y

45 - (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ .

El uso de un medio que comprende concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso de (i) o (ii) anteriores en la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota favorece la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras.

50

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: **etapas del procedimiento de una campaña de fermentación.** Se descongelan viales congelados, por ejemplo, de un banco de inóculos principal (PSB), en medio para serie de siembra. Aquí, se cultivan células durante aproximadamente tres semanas para recuperarse del estrés de descongelación (normalizando los tiempos de duplicación celular). Posteriormente se pasan las células a la serie de inoculación n-1 y n-2 para la expansión del cultivo. Después de aproximadamente una semana, se transfieren las células a la escala de producción para un procedimiento de fermentación discontinua de dos semanas.

60 Figura 2: **los procedimientos discontinuos se caracterizan por dos fases fenotípicamente distintas.** Se separa la fase de producción por dos segmentos donde dominan el crecimiento celular o bien la producción de proteínas diana.

65 Figura 3: **diferentes enfoques para los experimentos DoE.** Dependiendo del resultado del experimento deseado, se pueden usar diferentes enfoques DoE para la optimización del procedimiento. Por ejemplo, la optimización de tres factores varía normalmente entre un nivel mínimo (-1), medio (0) y máximo (+1) para los DoE de optimización.

(Imagen adoptada de <http://www.gmpua.com> y modificada)

Figura 4: **efecto de los oligoelementos sobre la galactosilación de mAb independiente del clon.** Se complementaron reservas salinas de aluminio, molibdeno, bario, cromo, bromo, yodo, cobre, manganeso, rubidio, plata, cinc, estaño y circonio en un cultivo discontinuo del clon 1 (n = 4) y clon 3 (n = 3) usando una plataforma de cultivo celular patentada A (medio y procedimiento) al comienzo del experimento. Se analizó el efecto de los oligoelementos sobre la galactosilación de mAb el día 7, 12 y 13 modelando los niveles de G1 (A, B) y G2 (C, D) con datos experimentales existentes. Cada punto en los gráficos *real* frente a *previsto* (A, C) representa un único experimento de cultivo. La significación estadística de cada oligoelemento en los niveles de G1 y G2 se centró por la media y se escaló por intervalo/2 para G1 (B) y G2 (D).

Figura 5: **momento de regulación de galactosilación de mAb por manganeso.** Se analizó el efecto significativo de manganeso sobre G1 (A) y G2 (B) de la formación de glucano del clon 3 (placa 5, 6 y 7) por la herramienta de perfil de predicción del programa informático JMP. El efecto positivo de manganeso sobre G1 y G2 difiere para las fases de procedimiento temprana (día 7) y tardía (día 13) hasta un 100 % (pendiente de la curva del perfil de predicción). Se realizó el experimento con n = 3.

Figura 6: **diferentes efectos de la complementación de cinc, hierro, cobre y manganeso combinada sobre el crecimiento celular, especies de glucoproteínas galactosiladas y no fucosiladas.** Se complementaron los experimentos discontinuos con el clon 2 con concentraciones variables de cinc, hierro, cobre y manganeso en un experimento DoE. Se analizaron los efectos para determinar la densidad celular viable máxima (A-C), integral con respecto al tiempo de células finales (D-F), especies G1 (G-I) y suma de especies manosiladas sin fuc. (J-L). Los modelos previstos (A, D, G, J) y estimaciones de parámetros ordenados (B, E, H, K) muestran la calidad y los oligoelementos para cada modelo específico con los factores significativos para el crecimiento celular y la glucosilación, respectivamente. Se determinaron las concentraciones óptimas (números en gris: concentración normalizada, línea horizontal punteada: valor máximo) de cinc, hierro, cobre y manganeso en cultivos discontinuos para el crecimiento celular óptimo (C, F), galactosilación óptima de la glucoproteína (I), y especies de glucoproteínas no fucosiladas (afucosiladas) altas (L) con la herramienta de maximización para el perfil de predicción JMP. Cabe destacar que, para la glucosilación, los oligoelementos metálicos cinc y cobre muestran interacciones invertidas.

Figura 7: **interacción de cinc y cobre en especies de glucoproteínas no fucosiladas.** Usando la herramienta de perfil de predicción JMP, se analizó el impacto de niveles de cinc en la correlación de cobre para las especies de glucanos manosiladas. Niveles moderados de cinc y cobre (A), niveles equilibrados de cinc y cobre (B), niveles altos de cinc y moderados de cobre (C), niveles bajos de cinc y bajos de cobre (D), niveles bajos de cinc y moderados de cobre (E), niveles altos de cinc y bajos de cobre (F), niveles moderados de cinc y altos de cobre (G), niveles altos de cinc y altos de cobre (H), niveles moderados de cinc y bajos de cobre (I) y nivel de cinc de -0,2 (es decir, 25,416  $\mu$ M) a altas concentraciones de cobre (J).

Figura 8: **concentraciones óptimas para cinc, hierro, cobre y manganeso en el crecimiento celular, especies de glucoproteínas galactosiladas y no fucosiladas.** Usando un único modelo de predicción válido para el nivel de VCD, CTI, de galactosilación de mAb y glucanos con alto contenido en manosa (Man5), se ilustran los efectos de diferentes variaciones de cinc, hierro, cobre y manganeso.

Figura 9: **modulación del crecimiento celular por concentraciones de oligoelementos seleccionadas.** Se sometieron a prueba las concentraciones de oligoelementos previstas que favorecen el crecimiento celular y la glucosilación de mAb en tres experimentos discontinuos en biorreactor, "*afucosilación*" (triángulo), "*crecimiento*" (cuadrado) y "*galactosilación*" (círculo) usando el clon 2 y el medio patentado y plataforma de procedimiento B (A). Se analizaron el efecto sobre la densidad celular viable (B), integral con respecto al tiempo de células (C) y viabilidad celular (D). Afucosilación es igual que no fucosilación.

Figura 10: **diferente metabolismo celular por complementación de cobre.** El uso del procedimiento de "galactosilación" en la fase de "glucosilación" (d6-d14) redujo los niveles de amonio finales (A) e incrementó los niveles de lactato (B). La evaluación de LDH como marcador para las células lisadas muestra una reducción en el nivel de un 50 % en comparación con el procedimiento de control y de "crecimiento".

Figura 11: **modulación de especies galactosiladas y no fucosiladas por concentraciones de oligoelementos seleccionadas.** Se sometieron a prueba las concentraciones de oligoelementos previstas que favorecen la glucosilación de mAb en tres experimentos discontinuos en biorreactor, "*afucosilación*" (triángulo), "*crecimiento*" (cuadrado) y "*galactosilación*" (círculo) usando el clon 2 y el medio patentado y la plataforma de procedimiento B. Se analizó el efecto de la modulación de oligoelementos seleccionados sobre la abundancia relativa de las especies Man5 (A), G0 (B) y G1 (C), así como para las especies no fucosiladas acumulativas (D).

Figura 12: **papel de los oligoelementos metálicos en el crecimiento celular y galactosilación/no fucosilación en el clon 1 - Experimento discontinuo en biorreactor** Se sometieron a prueba concentraciones de oligoelementos previstas que favorecen el crecimiento celular y la modulación de la maduración de glucosilación de mAb en tres experimentos discontinuos en biorreactor, combinando crecimiento celular bueno y malo durante la



serie de inoculación (fase n-2/n-1) y galactosilación y no fucosilación de mAb (formación de glucanos inmaduros) en discontinuo (fase n). Los casos de prueba deben modular específicamente el crecimiento celular, galactosilación de proteínas y glucosilación inmadura durante la serie de inoculación y la fase de producción (A). Las diferentes concentraciones de oligoelementos para la configuración de experimento destinada se representan en (B). El biorreactor "GG" (rombo) soporta el crecimiento celular y la galactosilación de proteínas, el biorreactor "GA" (cuadrado) soporta el crecimiento celular y la no fucosilación de mAb y el biorreactor "AA" (triángulo) reprime el crecimiento celular y desencadena la no fucosilación de proteínas. Se analizaron el efecto sobre la densidad celular viable (C), integral con respecto al tiempo de células (D), maduración de mAb (suma de especies G1 y G2) el día 6 y 14 (E) e inmaduración de mAb (suma de Man6, Man5 y G0-GlcNAc) el día 6 y 14 (F).

Figura 13: **concentraciones medidas de hierro, cinc, manganeso y cobre para el experimento en biorreactor 1.** Se muestran concentraciones reales de cobre (A), hierro (B), manganeso (C) y cinc (D) medidas por análisis ICP-EM del sobrenadante de cultivo celular. El incremento gradual de la concentración de cinc, hierro, manganeso y cobre teórica es la consecuencia de la alimentación en bolo el día 3, 5 y 9. El día 6 se dividió el cultivo.

Figura 14: **concentraciones de hierro, cinc, manganeso y cobre para cálculos medios en el experimento en biorreactor 2.** Concentraciones reales de cinc (A), manganeso (B), hierro (C) y cobre (D) para cultivos discontinuos representativos que incluyen las fases n-2, n-1, n del clon 1, clon 2, clon 3, clon 4 (n>3) medidas por análisis ICP-EM de sobrenadante de cultivo celular.

Figura 15: **interacción de cinc y manganeso en especies de glucoproteínas galactosiladas.** Usando la herramienta de perfil de predicción JMP, se analizó el impacto de niveles de cinc en la correlación de manganeso para las especies de glucanos galactosiladas G1 para el clon 2. Niveles bajos de cinc y niveles altos de manganeso (A), niveles bajos de cinc y niveles bajos de manganeso (B), niveles altos de cinc y niveles bajos de manganeso (C), niveles altos de cinc y niveles altos de manganeso (D).

Figura 16: **la interacción de cinc y manganeso en especies de glucoproteínas galactosiladas depende del tiempo.** Usando la herramienta de perfil de predicción JMP, se analizó el impacto de niveles de cinc en la correlación de manganeso para las especies de glucanos galactosiladas G1 y G2 para el clon 1 (n=4) y el clon 3 (n=3). Niveles altos de cinc y niveles altos de manganeso (A), niveles altos de cinc y niveles bajos de manganeso (B), niveles bajos de cinc y niveles bajos de manganeso (C), niveles bajos de cinc y niveles altos de manganeso (D).

## TERMINOLOGÍA

"Ajustar" como se usa en el presente documento se refiere a incrementar o disminuir la concentración de un elemento en el medio de cultivo. El incremento o disminución en la concentración del elemento es relativo a la concentración del elemento en el medio en la fase de cultivo que precede inmediatamente al ajuste. Por ejemplo, si el ajuste es un incremento en oligoelementos y se requiere al comienzo de la fase de producción, este es un incremento en la concentración de esos oligoelementos sobre la concentración de los elementos incluidos en el medio de la fase de crecimiento inmediatamente precedente.

"Ajustar la concentración" como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en la concentración medida o medible o en calculada o calculable real del elemento en el medio que rodea las células en un punto temporal dado.

"Afectar" como se usa en el presente documento se refiere a una acción que da como resultado un cambio en los procedimientos de la célula, ya sea la generación de biomasa o bien la madurez de N-glucano. El efecto resultante del mismo puede ser, por ejemplo, un incremento en la generación de biomasa o un incremento en la producción de una glucoproteína con el patrón de glucosilación deseado.

"Y/o" donde se usa en el presente documento se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de los dos rasgos característicos o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en el presente documento.

"Anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>, ya sea producido natural o de forma parcial o totalmente sintética. El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y cubre los anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina o anticuerpos monoclonales intactos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (típicamente genomanipulados para tener tres o más sitios de unión a antígeno), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, diacuerpos y moléculas monocatenarias tales como moléculas scFv, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv). Se incluyen dentro de la definición de anticuerpo los conjugados de anticuerpos, tales como los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) o los anticuerpos conjugados, por ejemplo, a elementos de marcaje.

- 5 "Biomasa" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad o peso de células cultivadas en el medio de cultivo. La biomasa se puede medir directa o indirectamente determinando la densidad celular viable, densidad celular total, integral con respecto al tiempo de células (para densidad celular viable y total), integral con respecto al tiempo del volumen celular (para densidad celular viable y total), hematocrito, peso seco o peso húmedo.
- 10 "Biorreactor" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier recipiente usado para el crecimiento de un cultivo de células de mamífero. Típicamente, un biorreactor tendrá al menos 1 litro y puede tener 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, incluyendo pero sin limitarse a pH, oxígeno disuelto y temperatura, se controlan típicamente durante el período de cultivo. Un biorreactor puede estar compuesto de cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamífero suspendidos en medios en las condiciones de cultivo de la presente invención, incluyendo vidrio, plástico o metal.
- 15 "Célula" y "línea celular" se usan en el presente documento de manera intercambiable y todas dichas designaciones incluyen la descendencia.
- "Densidad celular" como se usa en el presente documento se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio.
- 20 "Viabilidad celular" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir en un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en el presente documento también se refiere a la porción de células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas o muertas, en cultivo en ese momento.
- 25 "Quelante" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que puede suprimir la actividad química formando un quelato, es decir, por unión a un ion metálico.
- 30 "Concentración" como se usa en el presente documento en relación con los oligoelementos hierro, cobre, cinc y manganeso se refiere a la cantidad de cada oligoelemento comprendida dentro de un medio de cultivo. La concentración puede ser la concentración medida o medible o calculada o calculable real del elemento en el medio que rodea las células en un punto dado en el tiempo. Los procedimientos para medir la concentración de estos oligoelementos en el medio son conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen ICP-EM (Agilent, Böblingen, Alemania). Por tanto, la concentración también se refiere a la cantidad de cada oligoelemento comprendido en un medio de cultivo que rodea las células durante el cultivo, y es, por tanto, la concentración real del respectivo oligoelemento en un punto dado en el tiempo. Esta concentración se puede determinar analíticamente y resulta de, por ejemplo, la introducción del elemento en el cultivo (por peso, por transferencia de células y medio de un precultivo, por introducción de impurezas, por lixiviación, etc.), de la liberación por las células (por ejemplo, por la muerte de células o por secreción activa), por la captación por las células y otros factores.
- 35 40 "Cobre" como se usa en el presente documento se refiere al catión  $\text{Cu}^{2+}$ .
- 45 "Cultivo" o "cultivo celular" como se usa en el presente documento se refiere a una población celular que se suspende en un medio en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Estos términos también se aplicarán a la combinación del medio y la población celular suspendida en el mismo.
- 50 "Condiciones de cultivo" y "condiciones de fermentación" se usan en el presente documento de manera intercambiable y son las condiciones que se deben cumplir para lograr un cultivo celular con éxito. Típicamente, estas condiciones incluyen la provisión de un medio apropiado, así como el control de, por ejemplo, la temperatura, que debería ser de aproximadamente 37 °C, pero también podría incluir un cambio de temperatura durante el cultivo (por ejemplo, de 37 °C a 34 °C) y pH, que está normalmente entre 6,8 y 7,2, así como la provisión de oxígeno y dióxido de carbono. Dichas condiciones también incluyen la manera en que se cultivan las células, por ejemplo, cultivo con agitador o robótico.
- 55 "Disminución", como se usa en el presente documento con respecto a las concentraciones de los oligoelementos hierro, cobre, cinc o manganeso, quiere decir una disminución en la concentración de esos oligoelementos en el medio de cultivo en relación con su concentración en el medio en que se cultivaron las células en la fase inmediatamente precedente o la fase parcial.
- 60 "Favorecer" como se usa en el presente documento quiere decir que la actividad de la célula en la dirección establecida se potenciará en comparación con una célula cultivada en las mismas condiciones pero en las que las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso no se han ajustado de acuerdo con los presentes procedimientos. Por ejemplo, cuando se favorece la generación de biomasa, el ajuste de la concentración de oligoelementos en el medio dará como resultado que la célula se dirija más hacia la multiplicación que hacia la producción de glucoproteína. Existirá un incremento en la generación de biomasa como resultado. Sinónimos de "favorecer" en el presente documento son "incrementar" y "potenciar".
- 65

- 5 El "cultivo discontinuo" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al comienzo del procedimiento de cultivo. Un cultivo discontinuo se detiene típicamente en algún punto y las células y/o componentes en el medio se obtienen y opcionalmente se purifican.
- 10 "Galactosilada" como se usa en el presente documento con respecto a las glucoproteínas, se refiere a la glucoproteína que comprende uno o más residuos de galactosa, dando como resultado las glucoestructuras G1 y G2.
- 15 "Gen" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, ADN o ARN, de la que al menos una porción codifica un polipéptido. Opcionalmente, el gen comprende no solo la secuencia codificante para el polipéptido sino que también comprende regiones que preceden y/o siguen a la secuencia codificante que modulan el nivel basal de expresión y/o intrones entre los segmentos de codificación o exones.
- 20 "Glucoforma" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de varias formas diferentes de una glucoproteína que tiene diferentes sacáridos unidos.
- 25 "Glucoproteína" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína o polipéptido que contiene una o más cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Las cadenas de oligosacáridos pueden estar compuestas de un único residuo glucídico, una única cadena no ramificada o residuos glucídicos o pueden estar compuestas de una cadena de residuos glucídicos que se ramifica una o más veces. Las cadenas de oligosacáridos pueden estar unidas a N o unidas a O.
- 30 "Célula huésped" como se usa en el presente documento indica cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar glucoproteínas.
- "Incremento", como se usa en el presente documento con respecto a las concentraciones de los oligoelementos hierro, cobre, cinc o manganeso, quiere decir un incremento en la concentración de esos oligoelementos en el medio de cultivo en relación con su concentración en el medio en que se cultivaron las células en la fase inmediatamente precedente o la fase parcial.
- 35 "Hierro" como se usa en el presente documento quiere decir el catión Fe(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o bien el catión Fe(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ).
- "Manganeso" como se usa en el presente documento se refiere al catión  $\text{Mn}^{2+}$ .
- 40 "Madurez" y "madurez de glucoproteína" como se usa en el presente documento se refiere al patrón de glucosilación en glucoproteínas producidas de forma recombinante. Todas las proteínas N-glucosiladas tienen un núcleo pentasacárido en común (núcleo =  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ ) y la glucosilación terminal, que tiene lugar en el complejo de Golgi, da como resultado una enorme diversificación estructural debido a las diferentes combinaciones de oligosacáridos añadidos a ese núcleo. Por tanto, el incremento en la madurez en la glucoproteína se relaciona con la adición al núcleo, y/o la modificación posterior, de las unidades de oligosacáridos. Por tanto, un efecto sobre la madurez de N-glucano incluye incrementar la madurez de la glucoproteína en relación con la estructura central o en relación con la estructura de hidratos de carbono inmediatamente precedente. Por lo tanto, la madurez de la glucoproteína se incrementa a medida que la estructura central se modifica por la adición de unidades de oligosacáridos o por la retirada de, por ejemplo, residuos de manosa de una estructura híbrida inmadura. Por lo tanto, un incremento en la madurez cubre, por ejemplo, la producción de glucoproteínas con una estructura G0 a partir de, por ejemplo, una estructura  $\text{Man}_{3-5}$  o de una estructura central. Las especies de glucoproteínas completamente maduras pueden ser especies galactosiladas que contienen uno o dos residuos de galactosa o especies sialiladas que contienen uno o dos residuos de ácido siálico, tales como  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_1$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_1\text{Sia}_1$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{Sia}_1$  y  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{Sia}_2$ . Las glucoproteínas inmaduras pueden ser especies con alto contenido en manosa que contienen de cuatro a nueve residuos de manosa o estructuras híbridas inmaduras tales como  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ ,  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_4\text{GlcNAc}$  y  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ . En algunos casos es deseable producir glucoproteínas en las que los residuos glucídicos que se incorporan normalmente no se incorporen de esta manera. En el presente documento se incluyen glucoproteínas parcial o totalmente no fucosiladas que carecen de residuos de fucosa centrales, por ejemplo, G0-F, G1-F y G2-F. Las especies de glucoproteínas maduras e inmaduras pueden ser no fucosiladas, es decir, pueden carecer de residuos de fucosa centrales.
- 60 "Medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a una solución que contiene nutrientes que mantienen el crecimiento de células de mamífero. Típicamente, dichas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para un mínimo crecimiento y/o supervivencia. Una solución de este tipo también puede contener componentes complementarios que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluyendo, pero sin limitarse a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares, tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato, tampones, vitaminas,
- 65

nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos, aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. Un medio se formula ventajosamente a una concentración de pH y salina óptima para la supervivencia y proliferación celular. Un medio puede ser un medio de suero reducido o libre de suero, es decir, en el que el medio contiene aproximadamente un 1-5 % de suero o cuando el medio está esencialmente libre de cualquier suero de mamífero (por ejemplo, suero fetal bovino), respectivamente. Por esencialmente libre se quiere decir que el medio comprende entre un 0-5 % de suero, preferentemente entre aproximadamente un 0-1 % de suero y lo más preferentemente de aproximadamente un 0-0,1 % de suero. Se puede usar un medio definido libre de suero, donde la identidad y concentración de cada uno de los componentes del medio es conocida. Un medio puede ser un medio libre de proteínas, es decir, no contendrá proteínas pero contendrá péptidos indefinidos, por ejemplo, de hidrolizados vegetales. Los medios podrían incluir seroalbúmina humana y transferrina humana excepto insulina y lípidos potencialmente derivados de animales, o un medio sin material extraño ("*xeno-free*") que contiene seroalbúmina humana, transferrina humana, insulina humana y lípidos químicamente definidos. De forma alternativa, un medio puede ser un medio químicamente definido, es decir, un medio en el que todas las sustancias están definidas y presentes en concentraciones definidas. Estos medios podrían contener solo proteínas y/u hormonas recombinantes o un medio químicamente definido libre de proteínas, es decir, que contiene solo constituyentes de bajo peso molecular y péptidos/hormonas sintéticos si se requiere. Los medios químicamente definidos también podrían estar completamente libres de cualquier proteína.

"Glucoproteína no fucosilada" es una glucoproteína madura o inmadura que carece de uno o más residuos de N-fucosa centrales. Estas estructuras pueden ser *per se* no fucosiladas, ya que la glucoproteína no contiene naturalmente residuos de fucosa, o pueden no estar fucosiladas debido a la ausencia de un residuo de fucosa que se esperaría que estuviera presente naturalmente en la glucoproteína. En la presente solicitud, no fucosilado y afucosilado se usan de manera intercambiable.

"Cultivo de perfusión" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células que comprende células en crecimiento en un medio base de inoculación y, cuando las células logran una densidad celular deseada, se reemplaza el medio gastado con un medio recién preparado. La perfusión puede comprender perfusión continua o intermitente y puede incluir el suministro de al menos una alimentación en bolo al cultivo celular. Un cultivo de perfusión se puede seguir por un cultivo discontinuo.

"Polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos conjuntamente por medio de enlaces peptídicos. No se impone limitación de longitud en una cadena de aminoácidos de este tipo, que puede comprender de 2 a muchos aminoácidos. Los polipéptidos se pueden procesar y/o modificar, tal como por glucosilación.

"Proteína" como se usa en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Cuando la proteína contiene solo un polipéptido para funcionar, los términos polipéptido y proteína son intercambiables.

"Glucoproteína recombinante" o "glucoproteína expresada de forma recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a una glucoproteína expresada a partir de una célula huésped manipulada para los propósitos de dicha expresión. La manipulación incluye una o más modificaciones genéticas, tales como la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican la glucoproteína que se va a expresar. El gen heterólogo puede codificar una glucoproteína que se expresa normalmente en esa célula o bien que es exógena a la célula huésped. La manipulación puede ser de forma alternativa para regular por incremento o disminución uno o más genes endógenos.

"División" como se usa en el presente documento también es conocido como pases o subcultivo de células. Esto implica transferir una pequeña cantidad de células a un medio recién preparado, con lo que las células divididas siembran el nuevo cultivo. En cultivos en suspensión, una pequeña cantidad del cultivo que contiene algunas células se diluye en un volumen más grande de medio recién preparado.

"Valor" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de glucoproteína expresada de forma recombinante producida por un cultivo de células de mamífero en una cantidad dada de volumen de medio. El valor se expresa típicamente en unidades de miligramos de glucoproteína por mililitro de medio.

"Cinc" como se usa en el presente documento se refiere al catión  $Zn^{2+}$ .

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento:

Asn	Asparagina
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CTI	Integral con respecto al tiempo de células
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento

CMP	Monofosfato de citidina
CTP	Trifosfato de citidina
GDP	Difosfato de guanósina
GTP	Trifosfato de guanósina
ICP-EM	Plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas
LDH	Lactato deshidrogenasa
UDP	Difosfato de uridina
UTP	Trifosfato de uridina
mAb	anticuerpo monoclonal
PSB	Banco de inóculos principal
PSE	Pseudo error estándar
RSME	Error estándar de diseño
Fuc	L-fucosa
Gal	D-galactosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
NANA	Ácido N-acetilneuramínico
Man	D-manosa
Man5	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>5</sub>
Man6	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>6</sub>
Manosa alta	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>5-8</sub>
Núcleo	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>
G0	GlcNAc Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
G0-F	GlcNAc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
G1	GlcNAc Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal
G1-F	GlcNAc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal
G2	GlcNAc Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub>
G2 1SA	GlcNAc Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal <sub>2</sub> NANA <sub>1</sub>
Complejo	GlcNAc Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal <sub>0-2</sub>
Complejo-F	GlcNAc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Gal <sub>0-2</sub>

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Se describen procedimientos y medios para la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota, comprendiendo el procedimiento ajustar las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo durante el cultivo para afectar a la generación de biomasa y/o madurez de N-glucano de la glucoproteína expresada.

10 En un aspecto, el procedimiento de la invención comprende ajustar las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa. Como resultado de esto, existirá un incremento en la cantidad o peso de células cultivadas en el medio de cultivo. La biomasa se puede medir determinando la densidad celular viable, densidad celular total, integral con respecto al tiempo de células (para la densidad celular viable y total), integral con respecto al tiempo del volumen celular (para la densidad celular viable y total), hematocrito, peso seco o peso húmedo usando técnicas que son conocidas en la técnica.

15 El procedimiento de la presente invención, en un aspecto, comprende ajustar las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, en el medio de cultivo para afectar a la madurez de N-glucano en la glucoproteína expresada. La madurez de N-glucano se refiere al patrón de glucosilación, de modo que la glucoproteína contendrá todos, sustancialmente todos o menos que todos los residuos de glucano genéticamente diseñados, es decir, los residuos de glucano añadidos por glucoenzimas codificadas genéticamente endógenas.

25 En un modo de realización preferente, el ajuste de las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, en el medio de cultivo sería incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas. Los ejemplos del patrón de hidratos de carbono en dichas glucoproteínas expresadas son: GlcNAc Fuc GlcNAc Man<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub> (G0); GlcNAc Fuc GlcNAc Man<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Gal (G1) y GlcNAc Fuc GlcNAc Man<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Gal<sub>2</sub> (G2). También se incluyen aquí glucoproteínas no fucosiladas maduras, tales como GlcNAc GlcNAc Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (G0-F) y GlcNAc GlcNAc Man<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Gal<sub>0-2</sub> (G1-F, G2-F). En un modo de realización en particular preferente, el favorecer sería para glucoproteínas con una estructura de hidratos de carbono G0, G1 y/o G2.

En un modo de realización preferente alternativo, el ajuste de las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo afectaría a la producción de glucoproteínas que son glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. Los ejemplos del patrón de glucosilación en dichas glucoproteínas no fucosiladas inmaduras son glucoproteínas con alto contenido en manosa, es decir, las que contienen Man<sub>5</sub>, Man<sub>6</sub> y Man<sub>7</sub>, tales como: GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>5-8</sub>, por ejemplo, GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>5</sub> y GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>6</sub>.

La presente invención implica la producción de una glucoproteína recombinante. No existe limitación en la naturaleza de la glucoproteína, siempre que se pueda producir por cultivo de fermentación y expresar en una célula eucariota. Las glucoproteínas adecuadas para la producción por este procedimiento incluyen glucoproteínas secretadas y unidas a la membrana y/o glucoproteínas que pueden ser exógenas o endógenas a la célula eucariota, incluyendo, por ejemplo, glucoproteínas estructurales, hormonas, anticuerpos, enzimas y similares.

En un modo de realización preferente de la invención, la glucoproteína es un anticuerpo, típicamente un anticuerpo terapéutico o diagnóstico, y en otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Cuando la glucoproteína es un anticuerpo, el anticuerpo podría ser un anticuerpo terapéuticamente eficaz y se puede unir a cualquier proteína, incluyendo un miembro de la familia de las angiopoyetinas, tal como Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4 y anticuerpos biespecíficos para un miembro de la familia de las angiopoyetinas y, por ejemplo, VEGF, tal como Ang2/VEGF; un miembro de la familia de receptores HER, tal como HER1 (EGFR), HER2, HER3 y HER4; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44 y CD52; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, VLA04, ICAM-1, VCAM y una integrina, incluyendo subunidades  $\alpha$  o bien  $\beta$  de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11 b); factores de crecimiento tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de citocinas tales como receptor de linfopoyetina del estroma tímico (TSLP-R); IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB) y proteína C. Otras proteínas ejemplares incluyen hormona del crecimiento (GH), incluyendo hormona del crecimiento humana (hGH) y la hormona del crecimiento bovina (bGH); factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea, hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas;  $\alpha$ -1-antitripsina; cadena de insulina A; cadena de insulina B; proinsulina, hormona estimulante de los folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc; factor tisular (TF); factor von Willebrands; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno tal como urocinasa o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA), bombazina, trombina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; encefalinasa; RANTES (regulado en la activación normalmente de linfocitos T expresados y secretados); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1- $\alpha$ ); seroalbúmina tal como seroalbúmina humana (HSA); sustancia inhibidora de mulleriana; cadena A de relaxina, cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; proteína de activación de fibroblastos (FAP); antígeno carcinoembrionario (CEA); factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como 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) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); factor de crecimiento y transformación (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 insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento (IGFBP); eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón (interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ); factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10 e IL-17; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; receptor BlyS (Br3); inmunoadhesina Br3-Fc; receptor Apo-2; receptor Fc; proteínas de membrana superficial; factor de aceleración de la descomposición (DAF); un antígeno vírico, tal como por ejemplo una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de asentamiento; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; y fragmentos o variantes biológicamente activos de cualquiera de los anteriores. De forma alternativa, el anticuerpo podría ser un anticuerpo dirigido contra células epiteliales de mama o unirse a células de carcinoma de colon, anticuerpos anti-EpCAM, anticuerpos anti-Gp11b/IIIa, anticuerpos anti-VSR, anticuerpos anti-CMV, anticuerpos anti-VIH, anticuerpos antihepatitis, anticuerpos anti-CA 125, anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$ , anticuerpos contra carcinoma de células renales humanas, anticuerpos anti-17-1A humano, anticuerpos contra tumor colorrectal humano, anticuerpo contra melanoma humano R24 dirigido contra gangliósido GD3, anticuerpos contra carcinoma de células escamosas humano, contra antígeno leucocitario humano (HLA), anticuerpos anti-HLA DR.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la glucoproteína recombinante se produce en una célula eucariota. Cualquier célula eucariota susceptible para cultivo celular y para expresión de glucoproteínas se puede usar de acuerdo con la presente invención. La célula eucariota es preferentemente una línea celular eucariota que puede crecer y sobrevivir cuando se dispone en un cultivo en suspensión en un medio que contiene los nutrientes y factores de crecimiento apropiados y que típicamente puede expresar y secretar grandes cantidades de una glucoproteína particular de interés en el medio de cultivo.

En un modo de realización preferente, la célula eucariota es una célula de mamífero, una célula de levadura o una

célula de insecto.

5 Cuando la célula eucariota es una célula de mamífero, esta puede ser, por ejemplo, una línea celular de mieloma murino NSO, una línea CVI de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC® CRL 1651); línea de riñón embrionario humano 293S (Graham *et al.*, J. Gen. Virol. **36** (1977) 59); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC® CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. **23** (1980) 243); células de riñón de mono (CVI-76, ATCC® CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL 1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC® CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL 34);  
 10 células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC® CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL 51); células de hepatoma de rata (HTC, MI.54, Baumann *et al.*, J. Cell Biol., **85** (1980) 1); y células TR-1 (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. **383** (1982) 44), la línea celular PER.C6 (Percivia LLC) y líneas celulares de hibridoma.

15 Las células de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub y Chasin P. N. A. S. **77** (1980) 4216) o PER.C6 son líneas celulares preferentes para la práctica de la presente invención. Los derivados de CHO conocidos adecuados para su uso en el presente documento incluyen, por ejemplo, CHO/-DHFR (Urlab y Chasin, *supra*), CHOK1SV (Lonza), CHO-K1 DUC B11 (Simonsen y Levinson P. N. A. S. **80** (1983) 2495-2499) y células DP12 CHO (documento EP 307.247) y células CHO DG44 (Derouazi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **340** (2006) 1069-77).

20 Cuando la célula eucariota es una célula de levadura, esta puede ser, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Quando la célula eucariota es una célula de insecto, esta puede ser, por ejemplo, Sf-9.

25 La célula eucariota usada en la presente invención puede ser una célula de glucogenomanipulada, célula que se ha genomanipulado para modificar su perfil de glucosilación. Dicha genomanipulación incluye, por ejemplo, inactivación o activación de genes pertinentes para la síntesis de N-glucanos.

30 Lo más preferente es que en la presente invención, la célula sea una célula CHO, opcionalmente una célula CHO glucogenomanipulada.

35 La célula eucariota usada en la presente invención se selecciona o manipula para producir glucoproteína recombinante. La manipulación incluye una o más modificaciones genéticas, tales como la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican la glucoproteína que se va a expresar.

40 El gen heterólogo puede codificar una glucoproteína que se expresa normalmente en esa célula o bien que es exógena a la célula huésped. La manipulación puede ser, de forma alternativa o adicional, para regular por incremento o disminución uno o más genes endógenos. A menudo, las células se manipulan para producir glucoproteína recombinante, por ejemplo, por introducción de un gen que codifica la glucoproteína y/o por  
 45 introducción de elementos de control que regulan la expresión del gen que codifica la glucoproteína de interés. Los genes que codifican las glucoproteínas recombinantes y/o los elementos de control se pueden introducir en la célula huésped por medio de vectores, tales como un plásmido, fago o vector vírico. Determinados vectores se pueden replicar de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen, mientras que otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped y de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Diversos vectores están disponibles públicamente y la naturaleza precisa de los vectores no es esencial para la presente invención. Típicamente, los componentes del vector incluyen una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Dichos componentes son como se describen en el documento WO 97/25428.

50 La generación de biomasa y la expresión de glucoproteína a partir de células eucariotas se logra de acuerdo con el procedimiento de la invención por cultivo de las células en condiciones de fermentación. Cualquier procedimiento o sistema de cultivo celular de fermentación que sea susceptible al crecimiento de las células para la generación de biomasa y la expresión de glucoproteínas se puede usar con la presente invención. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en cultivos por lotes, discontinuos o divididos, donde el cultivo se termina después de que se haya  
 55 producido una expresión suficiente de la glucoproteína, después de esto se obtiene la glucoproteína y, si se requiere, se purifica. Si se usa un cultivo discontinuo, la alimentación del cultivo puede tener lugar una o más de una vez durante el cultivo. Cuando se dan múltiples alimentaciones, estas pueden ser con la misma o diferentes soluciones de alimentación. Como alternativa, las células se pueden cultivar en cultivos de perfusión, donde el cultivo no termina y se añaden periódicamente nuevos nutrientes y componentes de forma periódica o continua al  
 60 cultivo y se retira la glucoproteína expresada, de forma periódica o bien continua. En un modo de realización preferente, el procedimiento de cultivo celular usado en la presente invención es discontinuo o dividido o una combinación de los dos.

65 Los reactores, temperaturas y otras condiciones para el cultivo de fermentación de células para la generación de biomasa y la producción de glucoproteínas, tales como la concentración de oxígeno y el pH, son conocidos en la técnica. Cualquier condición apropiada para el cultivo de la célula eucariota seleccionada se puede elegir usando la

información disponible en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son típicamente las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la técnica. Si se desea, la temperatura y/o el pH y/o CO<sub>2</sub> se podrían alterar durante el cultivo para incrementar el rendimiento y/o incrementar la cantidad relativa de la calidad de glucoproteína deseada.

El medio en el que se cultivan las células y en el que las concentraciones de los oligoelementos hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser cualquiera de una amplia variedad conocida en la técnica. Si se desea, el medio podría ser un medio químicamente definido donde los componentes del medio son conocidos y controlados, o el medio podría ser un medio complejo en el que no todos los componentes son conocidos y/o controlados.

Los medios químicamente definidos se han desarrollado y publicado ampliamente en la historia reciente, incluyendo dichos medios para cultivo de células de mamífero. Todos los componentes de medios definidos están bien caracterizados y dichos medios no contienen aditivos complejos tales como suero e hidrolizados. Típicamente, estos medios incluyen cantidades definidas de factores de crecimiento, proteínas, lipoproteínas purificados, y otras sustancias que de otro modo se pueden proporcionar por complemento de extracto o suero. Dichos medios se han producido con el único propósito de soportar cultivos celulares altamente productivos. Determinados medios definidos se pueden denominar medios con bajo contenido en proteínas o pueden estar libres de proteínas si no se incluyen los componentes típicos de los medios con bajo contenido en proteínas, insulina y transferrina. Los medios libres de suero se pueden usar de otro modo en los procedimientos de la presente invención. Dichos medios normalmente no contienen fracciones de suero o proteína, pero pueden contener componentes indefinidos.

Los ejemplos de medios de cultivo disponibles comercialmente incluyen Ham's F10 (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) y medios químicamente definidos y complementos de alimentación vendidos por Life Technologies. Cualquiera de dichos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico); sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES); nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMYCIN™) y glucosa o una fuente de energía equivalente.

Los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el medio, incluyendo sus concentraciones, para una línea celular particular, se determinan empíricamente y sin experimentación excesiva como se describe, por ejemplo, en *Mammalian Cell Culture*, Mather (Plenum Press: NY 1984); Barnes y Sato, *Cell* **22** (1980) 649 o *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach* M. Butler (IRL Press, 1991). Un medio adecuado contiene un componente del medio basal, tal como la formulación basada en DMEM/HAM F12 con concentraciones modificadas de algunos componentes, tales como aminoácidos, sales, glúcidos y vitaminas, y opcionalmente que contienen glicina, hipoxantina, timidina, insulina humana recombinante, peptona hidrolizada, tal como PRIMATONE HS™ o PRIMATONE RL™ (Sheffield, Inglaterra) o el equivalente, un agente protector celular, tal como PLURONIC F68™ o el poliol plurónico equivalente y GENTAMYCIN™.

A continuación, la tabla 1 muestra las diferentes cantidades de los oligoelementos hierro, cobre, cinc y manganeso en diferentes medios de cultivo celular disponibles comercialmente, de los que cualquiera se puede usar para cultivo celular.

Tabla 1: concentraciones calculadas de hierro, cobre, cinc y manganeso en medios comerciales

	DMEM/F12	DMEM	HamF12	HamF10	RPMI	RPMI1640	199
µM							
Cu <sup>2+</sup>	0,0052	0,0000	0,0100	0,0100	0,0000	0,0050	0,0000
Fe <sup>3+</sup>	0,1240	0,2480	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,7822
Fe <sup>2+</sup>	1,5000	0,0000	3,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Zn <sup>2+</sup>	1,5000	0,0000	3,0000	0,1000	0,0000	3,0300	0,0000
Mn <sup>2+</sup>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000

RPMI1640 y 199 son Advanced Media

Las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso calculadas para estar en medios comerciales, como anteriormente, cambiarán si esos medios se complementan con ingredientes complejos, tales como suero o peptonas.

Cuando un procedimiento de la invención comprende ajustar las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo añadiendo esos oligoelementos al medio, o un medio comprende concentraciones ajustadas de esos elementos, los oligoelementos se pueden añadir o están presentes en el medio en forma de una sal metálica. Se puede usar cualquier sal de hierro, cobre, cinc y manganeso apropiada para su inclusión en un



medio de cultivo para la producción de una glucoproteína recombinante. En general es preferente que la sal metálica esté en forma del sulfato, haluro, óxido, nitrato, citrato, acetato o fosfato metálico apropiado, en forma hidratada o anhidra, o que el ion metálico esté unido a un quelante tal como transferrina o lactoferrina.

5 Típicamente, las sales de hierro (II) y (III) apropiadas para su uso en la presente invención incluyen citrato de Fe(III), FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y FePO<sub>4</sub> así como hierro unido a transferrina o lactoferrina.

Típicamente, las sales de cobre (II) apropiadas para uso en la presente invención incluyen CuSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub> y acetato de Cu.

10 Típicamente, las sales de cinc (II) apropiadas para su uso en la presente invención incluyen ZnSO<sub>4</sub> y ZnCl<sub>2</sub>.

Típicamente, las sales de manganeso apropiadas para su uso en la presente invención incluyen MnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MnF<sub>2</sub> y MnI<sub>2</sub>.

15 La presente invención proporciona un cultivo celular en condiciones de cultivo de fermentación. Típicamente, este es un procedimiento de cultivo de múltiples etapas donde las células se cultivan en varias etapas o fases. De acuerdo con este procedimiento preferente, el procedimiento de cultivo de fermentación, por ejemplo, a partir de viales congelados de células, típicamente cubre tres fases distintas, como se representa en la figura 1, es decir:

20 (i) la serie de siembra, para la recuperación de las células después del estrés de la descongelación y para normalizar los tiempos de duplicación celular, que pueden durar entre 14 y, por ejemplo, más de 60 días, dependiendo de la velocidad de recuperación celular y la escala de producción. En la figura 1, esto se representa con una duración de 21 días;

25 (ii) la fase de crecimiento, o serie de inoculación, llamada n-x fases (n es la fase de producción), en la que x es típicamente de 1 a 5, preferentemente 1 o 2. En la figura 1, se ilustran una fase n-1 y una n-2. Estas fases también se pueden denominar fase(s) de crecimiento en la(s) que las células se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y la generación de biomasa. Por tanto, las fases n-x son típicamente para la expansión del cultivo para formatos de cultivo más grandes y el lavado del compuesto seleccionado. Cuando las fases n-x consisten en una fase n-1 y n-2, cada una de las etapas n-1 y n-2 lleva, por ejemplo, de 2 a 7 días, típicamente cada una con duración de 3 o 4 días; y

35 (iii) la fase de producción, o fase n, para la producción de la glucoproteína recombinante en cantidad y/o calidad apropiadas. La duración de esta fase puede depender, por ejemplo, de la naturaleza de la célula recombinante así como de la cantidad y/o calidad de la glucoproteína expresada. Típicamente, esta fase durará entre aproximadamente 11 y aproximadamente 20 días. En la figura 1, esta fase se representa con una duración de 14 días.

40 Las células se pueden mantener en la serie de siembra o en la fase de crecimiento durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, por la adición de medio recién preparado o complementación de nutrientes al medio existente, según sea apropiado.

45 Típicamente, la producción o fase n se caracteriza por dos fases distintas, como se representa en la figura 2. La primera de ellas es una fase de crecimiento, para la generación de suficiente biomasa viable para la producción de proteínas específicas de células y la segunda de ellas es para la generación de la glucoproteína recombinante, sin crecimiento celular significativo.

50 Cualquiera o todas de la serie de siembra, la fase de crecimiento y la fase de producción pueden ser continuas, o las células de una fase se pueden usar para inocular la siguiente fase.

55 La recuperación de la glucoproteína expresada durante o bien al final de un período de cultivo, preferentemente la fase de producción, se puede lograr usando procedimientos conocidos en la técnica. La glucoproteína se recupera preferentemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque se puede recuperar de lisados de células huésped cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si la glucoproteína está unida a membrana, se puede liberar de la membrana usando una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o su región extracelular se puede liberar por escisión enzimática. La glucoproteína expresada se puede aislar y/o purificar de acuerdo según sea necesario usando técnicas conocidas en la técnica.

60 En el procedimiento de la presente invención, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan en cualquiera o todas las fases de crecimiento o producción del procedimiento de fermentación. En un modo de realización preferente, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan al comienzo de o durante la fase de crecimiento y/o al comienzo de o durante la fase de producción. Lo más preferente es que las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajusten al comienzo de la fase de crecimiento y al comienzo de la fase de producción o que las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajusten en cualquiera o todas del comienzo de la fase de crecimiento, durante la fase de crecimiento, al comienzo de la fase de producción y

durante la fase de producción.

Las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan incrementando o disminuyendo la concentración de esos oligoelementos en el medio de cultivo. En la presente invención, cuando la concentración de esos elementos se incrementa o disminuye, este incremento o disminución en la concentración es relativo a la concentración de esos elementos en el medio en la fase de cultivo que precede inmediatamente al incremento o disminución. Por tanto, si existe un incremento en la concentración de, por ejemplo, cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio al comienzo de la fase de producción, este es un incremento en la concentración de esos oligoelementos sobre la concentración de esos oligoelementos en el medio de la fase de crecimiento inmediatamente precedente. De forma similar, si debe existir un incremento en la concentración de, por ejemplo, cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio durante la fase de producción, este es un incremento en la concentración de esos oligoelementos sobre la concentración de esos elementos en el medio de la parte inmediatamente precedente de la fase de producción. De forma similar, si debe existir una disminución en la concentración de, por ejemplo, cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio al comienzo de o durante cualquiera de las fases de crecimiento o producción, esta es una disminución en la concentración de esos oligoelementos sobre la concentración de esos oligoelementos en el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente. De forma similar, si debe existir una disminución en la concentración de, por ejemplo, hierro y cobre y un incremento en la concentración de, por ejemplo, cinc y manganeso en el medio al comienzo de o durante la fase de producción, esta es una disminución en la concentración de hierro y cobre y un incremento en la concentración de cinc y manganeso en comparación con las concentraciones de esos oligoelementos en el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente.

En general, es preferente que cuando las concentraciones de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan en el medio de cultivo, las concentraciones de todos estos oligoelementos se ajusten al mismo tiempo. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención también incluye el ajuste de hierro, cobre, cinc y manganeso individualmente, en pares, o ajustando tres de estos oligoelementos a la vez y a continuación el cuarto, o viceversa. En particular, si la concentración de dos de los oligoelementos se va a incrementar y la concentración de dos de los elementos se va a disminuir, el ajuste para incrementar y disminuir puede tener lugar al mismo tiempo o en momentos diferentes. Es preferente, en ese caso, que el ajuste para incrementar la concentración de dos oligoelementos y disminuir la concentración de dos elementos tenga lugar en el mismo punto en el tiempo o en el mismo medio.

En el procedimiento de la presente invención, el ajuste de las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se puede lograr por cualquier técnica apropiada para las condiciones de fermentación que se están usando. El procedimiento por el que se ajustan las concentraciones de estos oligoelementos no es esencial para la presente invención y los procedimientos apropiados son conocidos en la técnica. Por tanto, el ajuste de la concentración de oligoelementos puede tener lugar complementando el medio (en el caso de un incremento en la concentración de cualquiera o todos los oligoelementos) en el que las células se están cultivando, o transfiriendo todas o una parte de las células (es decir, división) en un medio recién preparado que contiene las concentraciones deseadas de los oligoelementos. Se puede usar una combinación de estos dos procedimientos si se requiere.

Por lo tanto, el ajuste de la concentración de hierro, cinc, cobre y manganeso puede ser continuo, durante todo o parte del período de cultivo, o puede ser intermitente, por ejemplo, como reacción a la concentración supuesta, calculada o medida del/de los oligoelemento(s) en el medio de cultivo. La invención define el ajuste de la concentración de los oligoelementos dentro de los intervalos. Si la medición o cálculo real de la concentración de cada uno o todos los oligoelementos durante un período de cultivo definido, por ejemplo, durante la fase de crecimiento o producción, indica que la concentración de cada uno o todos los oligoelementos entra dentro de los intervalos mencionados en el presente documento, no obstante, el ajuste de esa concentración puede tener lugar, siempre que la concentración resultante del oligoelemento permanezca dentro del intervalo mencionado.

Si se requiere, se pueden usar técnicas conocidas para medir las concentraciones reales de los oligoelementos en el medio de cultivo antes de realizar los ajustes. Estos incluyen análisis en línea y fuera de línea de la concentración de oligoelementos respectiva.

Por tanto, si se están usando condiciones de fermentación por lotes, lograr un incremento en las concentraciones de los oligoelementos puede ser, por ejemplo, sembrando en un medio recién preparado que contiene o complementado con concentraciones de los oligoelementos apropiados que se incrementan sobre el medio de cultivo existente, o dividiendo las células en un medio que contiene o complementado con un incremento en las concentraciones de los oligoelementos apropiados sobre el medio existente. Si se están usando condiciones de fermentación discontinua, lograr un incremento en las concentraciones de los oligoelementos puede ser, por ejemplo, sembrando en un medio recién preparado que contiene o complementado con un incremento en las concentraciones de los oligoelementos apropiados, dando uno o más bolos o alimentaciones continuas de los oligoelementos apropiados al medio de cultivo; determinando una tasa de alimentación basada en el número de células o calculada de acuerdo con modelos metabólicos conocidos, marcadores metabólicos sustitutos, etc., o dividiendo el cultivo en un medio que contiene o se ha complementado con un incremento en las concentraciones de los oligoelementos apropiados. Si se está añadiendo alimentación en bolo o continua, esto puede contener otros

nutrientes/componentes requeridos para el cultivo además de todo o parte del hierro, cobre, cinc y manganeso. Si se están usando condiciones de fermentación de perfusión, se puede lograr un incremento en las concentraciones de los oligoelementos, por ejemplo, por una adición continua o intermitente de oligoelementos al reactor al mismo tiempo o por separado a otros nutrientes/componentes que se añaden al cultivo de perfusión.

5 Si se requiere una disminución en las concentraciones de cualquiera o todos de hierro, cinc, cobre y manganeso, esto se puede lograr sembrando las células en un medio recién preparado en el que las concentraciones de los oligoelementos se disminuyen en comparación con la concentración de esos oligoelementos en el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente. De forma alternativa, o además, se puede lograr una disminución en las  
10 concentraciones de cualquiera o todos de hierro, cinc, cobre o manganeso en un medio existente o recién preparado por complejación del ion metálico, por ejemplo por adición de un quelante de ion metálico al cultivo y lavado del ion metálico complejado. Se puede usar cualquier quelante de ion metálico que se pueda complejar al ion metálico apropiado para dar como resultado una disminución en la concentración biodisponible de ese ion metálico en el medio de cultivo. Dichos quelantes adecuados para hierro y cobre incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas o  
15 proteínas de unión a metales, tales como, por ejemplo, EDTA, EGTA, sideróforos tales como desferrioxamina, desferritocina, tetraciclina, quinolona, fosfonatos, polifenoles, proteínas tales como transferrina o ceruloplamina, polisacáridos, ácidos orgánicos tales como maleato, suprizona, sulfato de batocuproína, sulfonato de batofenantrolina y D-pencilamina. Además, el efecto de una disminución de la concentración de los oligoelementos se podría imitar por la inhibición/activación de enzimas de glucosilación por oligoelementos alternativos, por la  
20 competencia seleccionada con transportadores celulares o por la modulación seleccionada de la actividad del transportador celular.

Los valores específicos del incremento o disminución en las concentraciones de un metal se basan en mediciones reales del metal en el medio de cultivo o en concentraciones o cálculos teóricos de la concentración del metal en la  
25 solución de cultivo que rodea las células. El profesional apreciará que puede estar presente alguna concentración de los oligoelementos, introducidos por ejemplo por medio de impurezas y lixiviación, y los tendrá en cuenta al calcular una disminución o incremento en la concentración de los oligoelementos de acuerdo con la invención.

En los procedimientos de la presente invención, es preferente que se logre una disminución en la concentración de cualquiera o todos los oligoelementos, según sea apropiado, sembrando las células en un medio recién preparado en el que la concentración de los oligoelementos se disminuye en comparación con la concentración de esos  
30 oligoelementos en el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente.

En determinados modos de realización de la presente invención, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se pueden ajustar en el medio de cultivo para favorecer el crecimiento de las células y de este modo, incrementar la biomasa. En otros modos de realización, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso, o las concentraciones de solo cinc y manganeso, se pueden ajustar en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas y la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación  
35 maduro. En otro modo de realización, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se pueden ajustar para favorecer el incremento en la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. Aún en otro modo de realización, las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo se pueden ajustar en primer lugar para potenciar el crecimiento y a continuación de nuevo para afectar a la madurez de las glucoproteínas, ya sea incrementando la madurez de las glucoproteínas N-glucosiladas expresadas o bien incrementando la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras.  
40

En el procedimiento de la presente invención, aplicar diferentes concentraciones de oligoelementos al comienzo o durante las fases de crecimiento y/o producción puede provocar un efecto directo sobre la generación de biomasa y la madurez de la N-glucosilación en la glucoproteína expresada como se ilustra en la tabla 2, a continuación. El ajuste de las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso durante estas fases de cultivo da como resultado un cambio entre la generación de biomasa y la madurez de la N-glucosilación en las glucoproteínas expresadas.  
45 "Afucosilación" en la tabla 2 es igual que no fucosilación.

Tabla 2: estrategias de procedimiento para la producción de proteínas seleccionadas

(n - 2) Serie de inóculo Medio	(n - 1) Serie de inóculo Medio	(n) Medio de producción
A	Crecimiento	Galactosilación
B	Crecimiento	Crecimiento Galactosilación
C	Crecimiento	Afucosilación
D	Crecimiento	Crecimiento Afucosilación
E	Crecimiento	Crecimiento
F	Galactosilación	Galactosilación
G	Afucosilación	Afucosilación

Como resultado del procedimiento de la presente invención, las células productoras de glucoproteína se cultivan en un medio que se adapta al resultado final deseado. Por tanto, como se ilustra en la tabla 3, a continuación, un medio de crecimiento promueve principalmente la generación de biomasa, un medio de galactosilación promueve principalmente un incremento en la madurez de las N-glicoproteínas expresadas y la producción de glucoproteínas maduras, y un medio de no fucosilación promueve principalmente la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. Pueden existir algunos efectos interrelacionados de cada medio de modo que los otros resultados se pueden ver afectados en cierto grado, como se muestra a continuación, pero el resultado final deseado es el favorecido.

Tabla 3: relación entre los medios adaptados y el resultado deseado

Medio	Crecimiento	Galactosilación	No fucosilación
Soporte			
Generación de biomasa	+++	+	++
Galactosilación de proteínas	+	+++	-
No fucosilación de proteínas	++	-	+++

En un modo de realización preferente, la presente invención proporciona incrementar la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo para favorecer el crecimiento celular/generación de biomasa. En este modo de realización, la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso se incrementa al comienzo y/o durante la fase de crecimiento y, opcionalmente, también al comienzo y/o durante la fase de producción. Este modo de realización es en particular adecuado para células con baja capacidad de crecimiento, líneas celulares donde la biomasa y la productividad están acopladas y si se desean bajos niveles de glucoproteína galactosilada madura.

En un modo de realización preferente alternativo, la presente invención proporciona incrementar la concentración de cada uno de cinc y manganeso y, opcionalmente, reducir la concentración de hierro y cobre en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glicoproteínas expresadas, adecuadamente la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación maduro y de este modo, disminuir la producción de glucoproteínas inmaduras, incluyendo las glucoproteínas inmaduras no fucosiladas. En este modo de realización, la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso o solo de cinc y manganeso se ajusta al comienzo de la fase de crecimiento y/o al comienzo y/o durante la fase de producción. Favorecer el incremento en la madurez de las glucoproteínas y la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación maduro por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos durante las fases de crecimiento y producción es mejor cuando es deseable un bajo crecimiento celular, y en particular cuando la glucoproteína expresada es compleja con muchos productos secundarios inesperados. Favorecer el incremento en la madurez de las glucoproteínas y la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación maduro por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos en el medio al comienzo de la fase de producción es en particular útil cuando se ha logrado un buen crecimiento durante la fase de crecimiento. Favorecer el incremento en la madurez de las glucoproteínas y la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación maduro por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos en el medio durante la fase de producción es en particular adecuado cuando las concentraciones de los oligoelementos se han ajustado para la fase de crecimiento y al comienzo de la fase de producción para garantizar una buena generación de biomasa.

En un modo de realización preferente alternativo, la presente invención proporciona disminuir las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo para favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. En este modo de realización, la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajusta al comienzo de la fase de crecimiento y/o al comienzo de y/o durante la fase de producción. Favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos al comienzo de las fases de crecimiento y producción es mejor cuando el crecimiento celular es bueno. Favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos al comienzo de la fase de producción es en particular útil cuando se ha logrado un buen crecimiento durante la fase de crecimiento. Favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras por el ajuste de las concentraciones de los oligoelementos en el medio durante la fase de producción es en particular adecuado cuando las concentraciones de los oligoelementos se han ajustado para la fase de crecimiento y al comienzo de la fase de producción para garantizar una buena generación de biomasa.

En un modo de realización preferente alternativo, la presente invención proporciona incrementar la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo al comienzo de la fase de crecimiento y, opcionalmente al comienzo de la fase de producción, para favorecer el crecimiento celular/generación de biomasa y, adicionalmente, incrementar la concentración de cada uno de cinc y manganeso y reducir la concentración de hierro y cobre en el medio de cultivo al comienzo de o durante la fase de producción para incrementar la madurez de las glucoproteínas, por ejemplo para favorecer la producción de glucoproteínas con un patrón de N-glucosilación madura sobre la producción de glucoproteínas inmaduras, incluyendo las glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. En este modo de realización, cuando las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se incrementan al comienzo de la fase de producción para favorecer la generación de biomasa, incrementar la madurez de las glucoproteínas, por ejemplo favoreciendo la producción de glucoproteínas con un patrón de N-glucosilación madura, tiene lugar por otro ajuste de las concentraciones de esos oligoelementos durante la fase de producción.

En un modo de realización preferente alternativo, la presente invención proporciona incrementar la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo al comienzo de la fase de crecimiento y, opcionalmente al comienzo de la fase de producción para favorecer el crecimiento celular/generación de biomasa y adicionalmente disminuir las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo al comienzo de o durante la fase de producción para favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras. En este modo de realización, cuando las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se incrementan al comienzo de la fase de producción para favorecer la generación de biomasa, favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras tiene lugar por otro ajuste de las concentraciones de esos oligoelementos durante la fase de producción.

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de hierro, como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa se ajuste a entre  $15 \mu\text{M}$  y más de  $80 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $20 \mu\text{M}$  a más de  $60 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $25 \mu\text{M}$  a más de  $50 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de hierro, como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, para favorecer la producción de especies de glucoproteínas N-glucosiladas maduras, se ajuste a entre  $0 \mu\text{M}$  a  $25 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $20 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $16 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de hierro, como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la producción de especies de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras se ajuste a entre  $0 \mu\text{M}$  a  $35 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $30 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $25 \mu\text{M}$  o bien a entre  $15 \mu\text{M}$  a más de  $80 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $20 \mu\text{M}$  a más de  $60 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $25 \mu\text{M}$  a más de  $50 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cobre, como  $\text{Cu}^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa se ajuste a entre  $0,3 \mu\text{M}$  a más de  $2,5 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0,5 \mu\text{M}$  a más de  $1,5 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0,3 \mu\text{M}$  a más de  $1 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cobre, como  $\text{Cu}^{2+}$ , en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, para favorecer la producción de especies de glucoproteínas N-glucosiladas maduras se ajuste a entre  $0 \mu\text{M}$  y  $0,1 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $0,08 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $0,06 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cobre, como  $\text{Cu}^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la producción de especies de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras se ajuste a entre  $0 \mu\text{M}$  a  $1 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $0,5 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0 \mu\text{M}$  a  $0,3 \mu\text{M}$  o bien a entre  $0,3 \mu\text{M}$  a más de  $2,5 \mu\text{M}$ , preferentemente de  $0,5 \mu\text{M}$  a más de  $1,5 \mu\text{M}$  y lo más preferentemente de  $0,3 \mu\text{M}$  a más de  $1 \mu\text{M}$ .

En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cinc, como  $Zn^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa se ajuste a entre 20  $\mu M$  a más de 50  $\mu M$ , preferentemente de 25  $\mu M$  a más de 45  $\mu M$  y lo más preferentemente de 28  $\mu M$  a más de 43  $\mu M$ .

5 En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cinc, como  $Zn^{2+}$ , en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, para favorecer la producción de especies de glucoproteínas N-glucosiladas maduras se ajuste a entre 20  $\mu M$  a más de 50  $\mu M$ , preferentemente de 25  $\mu M$  a más de 45  $\mu M$  y lo más preferentemente de 28  $\mu M$  a más de 43  $\mu M$ .

10 En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de cinc, como  $Zn^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la producción de especies de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras se ajuste a entre 0  $\mu M$  a 20  $\mu M$ , preferentemente de 0  $\mu M$  a 15  $\mu M$  y lo más preferentemente de 0  $\mu M$  a 13  $\mu M$ .

15 En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de manganeso, como  $Mn^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa se ajuste a entre 0,01  $\mu M$  a más de 3  $\mu M$ , preferentemente de 0,05  $\mu M$  a más de 2  $\mu M$  y lo más preferentemente de 0,1  $\mu M$  a más de 1  $\mu M$ .

20 En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de manganeso, como  $Mn^{2+}$ , en el medio de cultivo para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, para favorecer la producción de especies de glucoproteínas N-glucosiladas maduras se ajuste a entre 0,01  $\mu M$  a más de 3  $\mu M$ , preferentemente de 0,05  $\mu M$  a más de 2  $\mu M$  y lo más preferentemente de 0,1  $\mu M$  a más de 1  $\mu M$ .

25 En un modo de realización preferente de la presente invención, es preferente que la concentración de manganeso, como  $Mn^{2+}$ , en el medio de cultivo para favorecer la producción de especies de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras se ajuste a entre 0  $\mu M$  a 0,01  $\mu M$ , preferentemente de 0  $\mu M$  a 0,05  $\mu M$  y lo más preferentemente de 0  $\mu M$  a 0,07  $\mu M$ .

30 Las concentraciones preferentes de las combinaciones de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo para los resultados adaptados de la presente invención son:

A. para favorecer la generación de biomasa:

- (a) hierro de 15  $\mu M$  a más de 80  $\mu M$ ;
- (b) cobre: de 0,3  $\mu M$  a más de 2,5  $\mu M$ ;
- (c) cinc: de 20  $\mu M$  a más de 50  $\mu M$ ; y
- (d) manganeso: de 0,01  $\mu M$  a más de 3  $\mu M$ .

B. para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, para favorecer la producción de glucoproteínas N-glucosiladas maduras:

(i)

- (a) hierro: de 0  $\mu M$  a 25  $\mu M$ ;
- (b) cobre: de 0  $\mu M$  a 0,1  $\mu M$ ;
- (c) cinc: de 20  $\mu M$  a más de 50  $\mu M$ ; y
- (d) manganeso: de 0,01  $\mu M$  a más de 3  $\mu M$ ; o

(ii)

- (a) cinc: de 20  $\mu M$  a más de 50  $\mu M$ ; y
- (b) manganeso: de 0,01  $\mu M$  a más de 3  $\mu M$ .

C. para favorecer la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras:

(i)

- (a) hierro: de 0  $\mu M$  a 35  $\mu M$ ;
- (b) cobre: de 0  $\mu M$  a 1  $\mu M$ ;

- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y
- (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ ; o bien

(ii)

- (a) hierro de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;

- (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;

- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y

- (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ .

Las combinaciones en particular preferentes de las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo para favorecer la generación de biomasa, incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo, la producción de glucoproteínas con un patrón de N-glucosilación madura, y/o favorecer la producción de las glucoproteínas no fucosiladas inmaduras son como se muestra en la tabla 4, a continuación.

Tabla 4: concentraciones de oligoelementos en fases de cultivo

Elemento	Medio	Crecimiento ( $\mu\text{M}$ )	Galactosilación ( $\mu\text{M}$ )		No fucosilación ( $\mu\text{M}$ )	
			Opción (i)	Opción (ii)	Opción (i)	Opción (ii)
Zn <sup>2+</sup>		28,295 - > 43,301	28,295 - > 43,301	28,295 - > 43,301	0,000 - 13,900	0,000 - 13,900
Mn <sup>2+</sup>		0,110 - > 1,000	0,110 - > 1,000	0,110 - > 1,000	0,000 - 0,075	0,000 - 0,075
Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>		25,472 - > 50,000	0,000 - 16,055	n/p	0,000 - 25,472	25,472 - > 50,000
Cu <sup>2+</sup>		0,329 - > 1,000	0,000 - 0,064	n/p	0,000 - 0,329	0,329 - > 1,000

(n/p = no procede)

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, incrementar los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio para favorecer, promover o incrementar la generación de biomasa durante el cultivo en condiciones de fermentación para producir una glucoproteína recombinante dará como resultado un incremento en la biomasa de al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o un 60 % sobre cultivos comparables en los que los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso no están ajustados. Los procedimientos para medir y cuantificar un incremento en el crecimiento celular son conocidos en la técnica. Típicamente, esto se puede realizar analizando la densidad celular viable máxima y la integral con respecto al tiempo de células finales.

Como es evidente para el experto en la técnica, en la producción de una glucoproteína recombinante, un incremento en la biomasa durante una etapa del cultivo celular dará como resultado un incremento en la cantidad de glucoproteína producida durante una etapa posterior del cultivo celular.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el ajuste seleccionado de los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, en el medio durante el cultivo en condiciones de fermentación para incrementar la madurez en las N-glucoproteínas expresadas, por ejemplo para favorecer, promover o incrementar la producción de glucoproteínas con un patrón de N-glucosilación madura dará como resultado un incremento en la producción de glucoproteínas N-glucosiladas maduras de al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o un 60 % sobre cultivos comparables en los que los niveles de concentración de hierro y cobre, y/o cinc y manganeso no se ajustan durante el cultivo.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el ajuste seleccionado de los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso, o solo de cinc y manganeso, en el medio durante el cultivo en condiciones de fermentación para favorecer, promover o incrementar la producción de glucoproteínas con un patrón G0, G1 o G2 dará como resultado un incremento en la producción de glucoproteínas con un patrón G0, G1 o G2 de al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 % sobre cultivos comparables en los que los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso no se ajustan durante el

cultivo.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el ajuste seleccionado de los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio durante el cultivo en condiciones de fermentación para favorecer, promover o incrementar la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras dará como resultado un incremento en la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras de al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o un 60 % sobre cultivos comparables en los que los niveles de concentración de hierro, cobre, cinc y manganeso no se ajustan durante el cultivo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

### EJEMPLOS

#### *Materiales y sustancias químicas*

##### *Líneas celulares*

Para el estudio descrito se usaron nueve líneas celulares CHO-K1 recombinantes generadas internamente: clon 1 y clon 2, que expresan ambos el mismo anticuerpo monoclonal, clon 3, que expresa otro anticuerpo monoclonal y clon A, clon B, clon C, clon D, clon E y clon F que expresan un anticuerpo glucogenomanipulado. En comparación con el clon 1, el clon 2 mostró altos niveles de especies de glucano con alto contenido en manosa (Man5). Se cultivaron todos los clones usando medio interno libre de proteínas patentado y químicamente definido, y plataformas de procedimiento, denominadas a continuación plataforma A y plataforma B.

##### *Control en procedimiento: crecimiento celular y análisis de metabolitos*

Se analizaron el crecimiento celular y la viabilidad usando el procedimiento de exclusión de azul tripano (Strober, Curr. Protoc. Immunol. Appendix 3 (2001)) y un dispositivo CedexHiRes automatizado (Roche Innovatis, Bielefeld, Alemania). Para la cuantificación de los metabolitos lactato y amonio, se centrifugó el fluido de cultivo celular para separar las células y se analizó usando un sistema Cobas Integra 400 plus (Roche, Mannheim, Alemania). Se cuantificó el título del producto por un sistema Cobas Integra 400 plus (Roche, Mannheim, Alemania) o por el procedimiento PorosA HPLC como se describe por Zeck *et al.* (PLoS. One **7.7** (2012) e40328).

##### *Control en procedimiento: oligoelementos*

Se analizaron las concentraciones de oligoelementos usando sobrenadante de cultivo libre de células y un procedimiento interno para un sistema ICP-EM (Agilent, Böblingen, Alemania).

##### *Experimentos DoE*

La planificación de experimentos estadística por DoE (diseño de experimentos) es una técnica potente y bien conocida, en especial para la optimización de reacciones biológicas y químicas donde muchos factores influyen de forma interdependiente en el resultado final. Por ejemplo, se usó con éxito DoE para la optimización de medios de cultivo celular (Zhang *et al.*, Cytotechnology **65.3** (2013) 363-78), procedimientos de fermentación (Fu *et al.*, Biotechnology Progress **28.4** (2012) 1095-105), procedimientos de purificación de proteínas (Pezzini *et al.*, J. Chromatogr. A **1218.45** (2011) 8197-208) y, condiciones de cultivo celular (Chen *et al.*, Tissue Eng. Part C. Methods **17.12** (2011) 1211-21).

En base al resultado deseado, se pueden aplicar diferentes enfoques de DoE al presente procedimiento (figura 3). Los diseños *factoriales fraccionados*, a menudo usados para sistemas con una gran cantidad de factores de influencia, permiten la identificación de moduladores principales significativos en el procedimiento. Por otra parte, los diseños experimentales como *Box-Behnken factorial completo* o *central compuesto* no solo identifican moduladores críticos sino que también permiten la cuantificación de concentraciones óptimas discretas o configuraciones de las mismas. Para eso, las llamadas herramientas de *perfil de predicción* postulan resultados de experimentos interactivos cuando las concentraciones o configuraciones de moduladores críticos varían *in silico* en un estado mínimo (-1) y máximo (1). Para calcular las concentraciones óptimas, el nivel óptimo previsto (un valor entre -1 y +1) se debe determinar por multiplicación con la concentración establecida usada.

Todos los enfoques DoE en este estudio se planificaron y analizaron usando la herramienta de programa informático estadístico JMP (SAS Institute GmbH, Böblingen, Alemania). Los experimentos se diseñaron como cultivos discontinuos para simular condiciones similares al procedimiento de producción. Todos los experimentos discontinuos con DoE se realizaron usando sistemas de cultivo agitadores o robóticos y medios de cultivo patentados y plataformas de alimentación A y B. Los medios de cultivo usados son medios libres de suero y proteínas definidos químicamente.

##### *Análisis de glucoespecies*



Para el análisis de la glucosilación de mAb, se centrifugó el fluido de cultivo celular obtenido para separación celular y se filtró por filtración con membrana de 0,2 µM. se analizaron las especies de glucosilación de mAb como se describe por Reusch *et al.*, (Anal. Biochem. **432.2** (2013) 82-89) y por un protocolo de electroforesis capilar interno.

**Ejemplo 1**

*Regulación inversa de galactosilación por manganeso y cobre*

Para someter a prueba la pertinencia general de estos oligoelementos en el rendimiento del cultivo celular, se usaron dos líneas celulares CHO-K1 recombinantes generadas internamente, clon 1 y clon 3, que expresan dos anticuerpos monoclonales diferentes, respectivamente. Usando un diseño DoE factorial fraccional (tabla 5) se puede analizar la significación estadística de diferentes oligoelementos (realizada por complementación de medio base con soluciones madre específicas). Se aplicó el enfoque DoE factorial fraccional a cada clon y en replicados (cuatro veces para clon 1, tres veces para clon 3) usando un sistema de cultivo robótico totalmente controlado.

**Tabla 5: cribado DoE factorial fraccional de oligoelementos en el rendimiento del cultivo celular.** Usando 17 experimentos discontinuos distintos, se aplican diferentes niveles equilibrados simétricos de soluciones madre de aluminio, molibdeno, bario, cromo, bromo, yodo, cobre, manganeso, rubidio, plata, cinc, estaño y circonio al medio base (-1: nivel bajo, 0: nivel medio, +1: nivel alto). Se aplicó el diseño del experimento tanto para el clon 1 (n=4) como para el clon 3 (n=3). Se generó el diseño del experimento usando la herramienta JMP DoE.

Experimento	Patrón	Al	Mo	Ba	Cr	Br	I	Cu	Mn	Rb	Ag	Zn	Sn	Zr
1	----+---+-----	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
2	----+---+-----	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
3	--+---+---+---+	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
4	--+---+---+---+	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	-+---+---+---+	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1
6	-+---+---+---+	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1
7	-+---+---+---+	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
8	-+---+---+---+	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
9	+---+---+---+---	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1
10	+---+---+---+---	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
11	+---+---+---+---	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
12	+---+---+---+---	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1
13	+---+---+---+---	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
14	+---+---+---+---	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
15	+---+---+---+---	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
16	+---+---+---+---	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0000000000000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A continuación se resumieron las concentraciones eficaces teóricas de aluminio, molibdeno, bario, cromo, bromo, yodo, cobre, manganeso, rubidio, plata, cinc, estaño y circonio ( $C_{TE\ eficaz}$ ) al comienzo del experimento discontinuo con DoE para cada condición (tabla 6). Se calculó la  $C_{TE\ eficaz}$  teórica para estos oligoelementos al comienzo del experimento de acuerdo con la ecuación 1:

(ecuación 1)

$$C_{TE\ eficaz} = \frac{((C_{TE\ Medio} * V_{Medio}) + (C_{TE\ Madre} * V_{TE\ Madre}))}{V_{Experimento}} * [\mu M]$$

**Tabla 6: concentraciones de oligoelementos eficaces teóricas  $C_{TE\ eficaz}$  al comienzo del experimento discontinuo con DoE factorial fraccional (ejemplo 1).**

	-1 (nivel bajo)	0 (nivel medio)	+1 (nivel alto)
<b>Componente</b>	[µM]	[µM]	[µM]
<b>Al<sup>3+</sup></b>	0,0023	0,0262	0,0502
<b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	0,0047	0,0095	0,0144

	-1 (nivel bajo)	0 (nivel medio)	+1 (nivel alto)
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	0,0049	0,0566	0,1083
<b>Cr<sup>3+</sup></b>	0,0005	0,0056	0,0107
<b>Br<sup>-</sup></b>	0,0007	0,0383	0,0759
<b>I<sup>-</sup></b>	0,0005	0,0060	0,0114
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	0,3142	0,3471	0,3800
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,0832	0,0898	0,0963
<b>Rb<sup>+</sup></b>	0,0024	0,0516	0,1009
<b>Ag<sup>+</sup></b>	0,0006	0,0065	0,0125
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	13,9898	17,6545	21,3193
<b>Sn<sup>2+</sup></b>	0,0005	0,0030	0,0054
<b>ZrO<sup>2+</sup></b>	0,0047	0,0537	0,1027

5 Se analizó el impacto putativo del aluminio, molibdeno, bario, cromo, bromo, yodo, cobre, manganeso, rubidio, plata, cinc, estaño y circonio en la galactosilación por niveles de glucanos G1 y G2 relativos combinando ambos clones (clon 1 y clon 3, expresando ambos diferentes mAb) y muestras de los días 7, 12 y 13 para identificar efectos independientes de clones y temporales generales.

10 Usando la herramienta de análisis JMP DoE, se encontró un buen modelo lineal que describe el impacto de los oligoelementos en la galactosilación de mAb. Aquí, se observó un fuerte efecto positivo para manganeso en los niveles G1 y G2 (figura 4A-D). Además, el cinc tiende a tener un efecto positivo sobre la abundancia de G1 y G2 relativa. Por otra parte, el cobre tiene un impacto negativo estadísticamente significativo en la formación de glucano G1 (figura 4A-B), lo que indica que el efecto inhibitorio observado *in vitro* (como se detalla por Kamińska J *et al.*, Glycoconj J. **15.8** (1998) 783-8) se puede confirmar *in vivo* por experimentos de cultivo celular.

15 De forma interesante, la adición de cinc en combinación con manganeso reveló un efecto sinérgico sobre la formación de glucano galactosilado y el efecto parece que es dependiente del tiempo del procedimiento. Para la cuantificación del efecto, se modeló la formación de G1 y G2 solo con los efectores cinc y manganeso en concentraciones altas y bajas (figura 16). La mayor cantidad de especies G1 y G2 está prevista para alto nivel de manganeso en combinación con altos niveles de cinc.

20 Usando las estimaciones escaladas del experimento de cribado (figura 4B, D), la concentración óptima para la galactosilación se puede resumir como:

25 • Manganeso: > **0,0963 µM**, puesto que el modelo lineal muestra los mejores resultados a la mayor concentración → concentración óptima aún no alcanzada)

• Cobre: < **0,3142 µM**, puesto que en un modelo lineal muestra el mejor resultado a la menor concentración → concentración óptima aún no alcanzada).

30 Se analiza además el momento del efecto de los elementos significativos anteriores sobre la galactosilación usando el clon 3 como línea celular modelo. Al cambiar del día 7 al día 13 usando la herramienta de perfil de predicción, se cuantificó el impacto del manganeso en una fase de producción temprana y tardía. Tanto para G1 como para G2, el efecto del manganeso descendió en las últimas fases del procedimiento (día 13). La disminución de la pendiente en la curva de perfil de predicción indica que la biodisponibilidad del manganeso no es tan buena como en fases del procedimiento tempranas (día 7) (figura 5).

### 35 Ejemplo 2

#### *Efectos inversos de cobre y hierro sobre el crecimiento celular y la glucosilación*

40 Para identificar oligoelementos únicos y efectos combinados responsables del crecimiento celular y la modulación de la glucosilación, se analizó el impacto de cinc, cobre, hierro y manganeso, conocidos como oligoelementos altamente bioactivos, en el crecimiento celular y la glucosilación de mAb por un experimento DoE factorial completo usando el clon recombinante 2 (tabla 7). Se usó el clon 2 como línea celular indicadora debido al nivel de formación elevado endógeno de las estructuras de glucano de alto contenido en manos.

45 **Tabla 7: cribado de DoE factorial completo de cinc, hierro, cobre y manganeso en el crecimiento celular, especies de glucoproteínas galactosiladas y no fucosiladas.** Usando 19 experimentos con agitador discontinuos distintos con el clon 2, se aplicaron diferentes niveles equilibrados simétricos de cinc, hierro, cobre y manganeso al medio base (-1: nivel bajo, 0: nivel medio, +1: nivel alto). Se usaron tres puntos centrales ("0000": agitador 5, 8 y 11) para identificar la varianza del experimento intrínseca. Se generó el diseño del experimento usando la herramienta

50

JMP DoE.

agitador	Patrón	Cinc	Hierro	Cobre	Manganeso
1	++++	1	1	-1	1
2	++--	1	1	-1	-1
3	+---	1	-1	-1	-1
4	--++	-1	-1	1	1
5	0000	0	0	0	0
6	-+++	-1	1	-1	1
7	++++	1	-1	-1	1
8	0000	0	0	0	0
9	++++	1	1	1	1
10	---+	-1	1	1	-1
11	0000	0	0	0	0
12	--+-	-1	-1	1	-1
13	+-+-	1	-1	1	-1
14	----	-1	-1	-1	-1
15	+++-	1	1	1	-1
16	++++	1	-1	1	1
17	-+-	-1	1	-1	-1
18	+++	-1	1	1	1
19	---	-1	-1	-1	1

5 En este ejemplo, las concentraciones eficaces teóricas de cinc, hierro, cobre y manganeso  $C_{TE\ eficaz}$  al comienzo del experimento discontinuo con DoE se resumieron para cada condición (tabla 8). Se calculó la  $C_{TE\ eficaz}$  teórica para cinc, hierro, cobre y manganeso al comienzo del experimento como se describe anteriormente.

10 **Tabla 8: concentraciones eficaces teóricas de cinc, hierro, cobre y manganeso  $C_{TE\ eficaz}$  al comienzo del experimento discontinuo con DoE (ejemplo 2)**

	-1 (nivel bajo)	0 (nivel medio)	+1 (nivel alto)
Componente	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]
$\text{Cu}^{2+}$	0,312	0,330	0,362
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	1,890	25,386	48,965
$\text{Mn}^{2+}$	0,071	0,081	0,091
$\text{Zn}^{2+}$	13,900	28,295	43,301

15 El mayor efecto sobre el crecimiento celular, analizado por la densidad celular viable máxima (figura 6A-C) e integral con respecto al tiempo de células finales (figura 6D-F) se mostró por la complementación de hierro. En general, las altas concentraciones de cinc, manganeso y cobre usadas en el experimento tienden a dar como resultado un mayor crecimiento celular y generación de biomasa (figura 6C, F). Por otra parte, la combinación seleccionada de cinc, cobre, hierro y manganeso moduló la cantidad de especies galactosiladas o no fucosiladas. Las altas concentraciones de manganeso mejoran la galactosilación, mostrada aquí para G1 (figura 6G-I), mientras que el efecto combinado de cinc y cobre y la falta de manganeso da como resultado mayores cantidades de especies de mAb glucosiladas inmaduras (figura 6J-L).

25 El cobre y el cinc muestran una fuerte interacción en la formación de glucanos inmaduros. Por lo tanto, se analizó además esta interacción en especies de glucanos no fucosiladas (glucoproteínas con un alto contenido en manosa) en detalle usando la herramienta de perfil de predicción JMP. En general, en niveles moderados (nivel 0 en el experimento), el cinc (nivel 0 quiere decir 28,295  $\mu\text{M}$ ) mostró una correlación negativa y el cobre (nivel 0 quiere decir 0,330  $\mu\text{M}$ ) positiva con la cantidad de glucanos con alto contenido en manosa (figura 7A). Esto se confirma por el hecho de que el nivel de cinc negativo de -0,2 (quiere decir 25,416  $\mu\text{M}$ ) y un nivel de cobre positivo de 0,6 (quiere decir 0,349  $\mu\text{M}$ ) ya no muestran un impacto en la suma de las especies de glucanos manosiladas (figura 7B). A continuación, se simuló diferentes escenarios de moduladores significativos de cinc, cobre y manganeso en especies de glucano con alto contenido en manosa:

30 • Los niveles moderados y altos (de -0,2 a 1 quiere decir de 25,416  $\mu\text{M}$  a 43,301  $\mu\text{M}$ ) de cinc inducen un efecto positivo de cobre (figura 7C, F, G, H, I)

• Los niveles bajos (de -1 a -0,2 quiere decir de 13,900  $\mu\text{M}$  a 25,416  $\mu\text{M}$ ) de cinc inducen un efecto negativo de cobre (figura 7D, E)

5 • Un nivel moderado (-0,2 quiere decir 25,416  $\mu\text{M}$ ) de cinc destruye el efecto del cobre (figura 7B, J)

• El efecto negativo de manganeso es independiente de los niveles de cinc y cobre.

10 Se usó la herramienta de perfil de predicción de JMP para determinar las concentraciones óptimas de cinc, cobre, hierro y manganeso para una optimización combinada del crecimiento celular y la formación de glucano de mAb. Aquí, se usó un modelo válido que considera todos los parámetros de oligoelementos (efecto cuadrático del hierro).

15 de acuerdo con el perfil de predicción, cinc, cobre y manganeso en las mayores concentraciones y hierro a niveles > 0,42 (es decir > 36,704  $\mu\text{M}$ ) mejorarán el crecimiento celular (figura 8A, C). El uso de altas concentraciones de cinc, hierro y manganeso y una baja concentración de cobre incrementará la cantidad de especies de mAb galactosiladas (figura 8D). Por otra parte, las bajas concentraciones, nivel -1, de manganeso (es decir, 0,071  $\mu\text{M}$ ), cobre (es decir, 0,312  $\mu\text{M}$ ) y cinc (es decir, 13,900  $\mu\text{M}$ ) y hierro a niveles de -0,3 (es decir, 11,288  $\mu\text{M}$ ) en paralelo incrementan la cantidad de especies de mAb no fucosiladas (figura 8F).

20 Se alcanza un mínimo para VCD y CTI cuando se elige un alto nivel de cinc y cobre y bajos niveles de hierro y manganeso (figura 8B). Se generan especies de glucanos con baja galactosilación eligiendo bajas concentraciones de los cuatro elementos (figura 8D). Se genera un nivel mínimo de glucanos manosilados para altos niveles de cinc y manganeso y bajos niveles de hierro y cobre (figura 8G).

25 De nuevo, también se sometió a prueba la opción para la adición de cinc en combinación con manganeso solo para incrementar la formación de glucano galactosilado por el modelado JMP de los datos. Como se muestra anteriormente, cinc y manganeso tienen un efecto sinérgico sobre la formación de glucano galactosilado. Para la cuantificación del efecto, se modeló la formación de G1 con los efectores cinc y manganeso a altas y bajas concentraciones (figura 15). La adición de altos niveles de cinc con altos niveles de manganeso puede incrementar las especies G1 en un 17 % (figuras 15A, D).

30 Para modular el grado de madurez de las especies de glucanos, los niveles de oligoelementos óptimos son una combinación de G1 y predicciones de alto contenido en manosa (figura 8D-G).

35 • Para glucanos maduros: niveles óptimos para G1 alto y Man5 bajo

• Para glucanos inmaduros: niveles óptimos para Man5 alto y G1 bajo.

**Ejemplo 3**

40 *Producción seleccionada de especies de glucanos galactosiladas y no fucosilados por modulación de cobre, hierro, cinc y manganeso: Experimento con biorreactor 1*

45 Se cultivó el clon 2 CHO-K1 durante 14 días en sistemas de fermentación Quad de 2 l controlados (Sartorius, Gotinga, Alemania) usando el medio patentado y la plataforma de procedimiento de alimentación en bolo B. Se complementó la alimentación de nutrientes concentrada a un 10 % del volumen de comienzo de cultivo el día 3, 6 y 9. Se realizó la modulación de oligoelementos seleccionada por complementación de medio específico que favorece la glucosilación de mAb el día 6.

50 Las proporciones y concentraciones seleccionadas de cinc, cobre, hierro y manganeso identificadas en experimentos previos se resumen en la tabla 9. Estas concentraciones y proporciones de cinc, cobre, hierro y manganeso se sometieron a prueba en un experimento de verificación discontinuo con biorreactor usando el clon 2 con altos niveles endógenos de especies de glucano Man5. Se modularon las proporciones de oligoelementos usando una estrategia de división de cultivo y complementación seleccionada para soportar el crecimiento celular en la primera fase discontinua (d0-d5) y permitir la maduración de la glucosilación de mAb en la segunda fase discontinua (d6-d14), usando dos medios de cultivo diferentes para las fases "biomasa" y "glucosilación" como se describe en la tabla 9A y tabla 9B, respectivamente.

60 **Tabla 9A: medio de "biomasa" usado en el experimento con biorreactor para la fase de crecimiento de d0-d5.**

	Galactosilación	Crecimiento	No fucosilación
<b>Componente</b>	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	0,064	0,329	1,000
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	47,158	47,158	50,000

	Galactosilación	Crecimiento	No fucosilación
Mn <sup>2+</sup>	0,029	0,029	0,004
Zn <sup>2+</sup>	41,072	41,072	11,061

**Tabla 9B: medio de "glucosilación" usado en el experimento con biorreactor para la fase de glucosilación de d6-d14.**

Componente	Galactosilación [μM]	Crecimiento [μM]	No fucosilación [μM]
Cu <sup>2+</sup>	0,000	0,329	1,000
Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	0,000	0,000	50,000
Mn <sup>2+</sup>	0,029	0,029	0,004
Zn <sup>2+</sup>	41,072	41,072	11,061

En comparación con una configuración para favorecer la formación de glucanos inmaduros, llamada "*no fucosilación*", con concentraciones constantes de cinc, cobre, hierro y manganeso durante todo el procedimiento, se sometieron a prueba las concentraciones de oligoelementos previstas para el crecimiento celular dirigido y la maduración de la glucosilación de mAb variando solo la concentración de cobre entre dos niveles, a continuación llamado "*crecimiento*" y "*galactosilación*" (figura 9A). Se decidió hacerlo así puesto que el cobre parece tener un efecto más fuerte sobre la glucosilación que sobre la densidad celular viable máxima (figura 8).

La siguiente tabla (tabla 10) muestra las concentraciones objetivo teóricas usadas para el experimento con biorreactor 1.

**Tabla 10: concentraciones de oligoelementos teóricas objetivo que modulan el crecimiento celular, la galactosilación de mAb y la no fucosilación.** Concentraciones de cobre, manganeso, hierro y cinc usadas en el experimento con biorreactor 1, véase la configuración en la figura 9A.

Componente	baja [μM]	media [μM]	alta [μM]
Cu <sup>2+</sup>	0,064	0,329	1,000
Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	16,055	n/p	50,000
Mn <sup>2+</sup>	0,075	n/p	0,099
Zn <sup>2+</sup>	11,250	n/p	41,072

(n/p, no procede)

Usando esta configuración, se probó que hasta el día 6 la capacidad de crecimiento celular se puede modular equilibrando los oligoelementos lo que muestra la mayor densidad de células viables y CTI para "*crecimiento*", seguido de los procedimientos de "*no fucosilación*" y "*galactosilación*" (figura 9B, C) El cambio posterior a condiciones que favorecen la glucosilación y la reducción en el crecimiento celular del día 6 en adelante se mostró claramente para el procedimiento de "*galactosilación*" para la densidad celular viable y la integral con respecto al tiempo de células. De forma interesante, la modulación de las proporciones de oligoelementos muestra un fuerte efecto sobre la viabilidad celular en las fases del procedimiento tardías (figura 9D). La reducción de cobre tiende a incrementar la densidad celular viable final hasta casi un 30 % de viabilidad (para el procedimiento de "*galactosilación*") en comparación con el procedimiento de "*crecimiento*". El efecto del incremento en la viabilidad celular por la reducción en la concentración de cobre también se podría confirmar por análisis de liberación de LDH (figura 10C).

Por otra parte, se ha demostrado que el cobre influye positivamente en la remetabolización de lactato en las fases del procedimiento tardías (Luo *et al.*, Biotechnol. Bioeng. **109.1** (2012) 146-56). En el experimento de verificación descrito anteriormente, se confirmó la pertinencia de cobre para la remetabolización de lactato, puesto que la "*galactosilación*" mostró un incremento pero no crítica (→ alta viabilidad celular) en la concentración de lactato en fases del procedimiento tardías en comparación con "*no fucosilación*" y "*crecimiento*", donde hasta el día 14 se consume casi todo el lactato (figura 10B). Como es conocido que los altos niveles de lactato pueden favorecer la desintoxicación de amonio (Li *et al.*, Biotechnol. Bioeng. **109.5** (2012) 1173-86), se podría confirmar para el procedimiento de "*galactosilación*" la correlación inversa de la acumulación de lactato y la reasimilación de amonio (figura 10A).

Para estudiar el efecto de la modulación de oligoelementos en la cinética de glucosilación de mAb, se analizaron

muestras de procedimiento de ciclos de biorreactores para especies no fucosiladas y galactosiladas. Las especies con alto contenido en manosa Man5 (figura 11 A), así como especies no fucosiladas acumulativas (figura 11D) se pueden reducir (hasta un 30 % para Man5) por la modulación de oligoelementos prevista de manera dependiente de la concentración de cobre (concentración de cobre: "no fucosilación" > "crecimiento" > "galactosilación"). La modulación de oligoelementos da como resultado un cambio de especies con alto contenido en manosa a G0 (hasta un 30 %) y posteriormente a especies G1 (hasta un 30 % el día 13) una vez que el procedimiento cambia de condiciones de crecimiento a glucosilación (figura 11A-C). El descenso de las especies G1 en la configuración de "galactosilación" el día 14 puede estar provocado por la limitación de Mn<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> biodisponibles en las fases del procedimiento tardías.

**Ejemplo 4**

*Modulación seleccionada del crecimiento celular y glucosilación de mAb por hierro, cobre, cinc y manganeso: experimento con biorreactor 2*

Se cultivó el clon 2 CHO-K1 en matraces con agitación para la expansión del cultivo y 14 días en sistemas de fermentación Quad de 2 l controlados (Sartorius, Göttingen, Alemania) para la producción de cultivo discontinuo para evaluar el impacto de hierro, cobre, cinc y manganeso para el crecimiento celular y glucosilación de proteínas. Se usaron el medio patentado y la plataforma de procedimiento B. Se complementó la alimentación de nutrientes concentrada continuamente a un 2,73 % (v/v) por día y de volumen de comienzo de cultivo inicial. Se realizó la modulación de oligoelementos seleccionada usando concentraciones de metales específicas en medios de cultivo y alimentación continua (tabla 11-13) y por la división del cultivo durante la serie de inoculación (fase n-2 y n-1) y transferencia a escala de producción (fase n). Se calcularon las concentraciones respectivas de hierro, cinc, cobre y manganeso en base a las tasas específicas de consumo de células y sistemas de cultivo (figura 13 y 14) y considerando el equilibrio de volumen durante la división y el cultivo (por ejemplo, complementación de agentes de corrección tales como reserva de glucosa, antiespumante, base). Se pueden medir las concentraciones reales de hierro, cinc, cobre y manganeso con ICP-EM (Agilent, Böblingen, Alemania).

Se diseñaron los casos de prueba para soportar el crecimiento celular durante la expansión del cultivo celular, generación de biomasa inicial en discontinuo y galactosilación de proteínas en la fase de producción durante el cultivo discontinuo (día 6-14) o para soportar el crecimiento celular durante la expansión del cultivo celular, generación de biomasa inicial en discontinuo y no fucosilación de proteínas en la fase de producción durante el cultivo discontinuo (día 6-14) o bien para interferir con el crecimiento celular durante la expansión del cultivo celular, generación de biomasa inicial en discontinuo y para soportar la no fucosilación de proteínas en la fase de producción durante el cultivo discontinuo (día 6-14) (figura 12A).

**Tabla 11: concentraciones de oligoelementos teóricas al comienzo de cada fase de cultivo para la modulación del crecimiento celular y la glucosilación de mAb: "crecimiento/crecimiento" (GG).** Concentraciones de cobre, manganeso, hierro y cinc usadas en el experimento de verificación con biorreactor 2, véase la configuración en la figura 12A.

	Fase n-2	Fase n-1	Fase n
Componente en el medio:	[µM]	[µM]	[µM]
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	1,000	1,000	0,550
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	50,000	50,000	40,000
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	1,000	1,000	1,000
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	43,000	43,000	43,000
<b>Componente en alimentación:</b>			
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	np	np	np
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	np	73,000	np

(np, no procede)

**Tabla 12: concentraciones de oligoelementos teóricas al comienzo de cada fase de cultivo para la modulación del crecimiento celular y la glucosilación de mAb: "crecimiento/no fucosilación" (GA).** Concentraciones de cobre, manganeso, hierro y cinc usadas en el experimento de verificación con biorreactor 2, véase la configuración en la figura 12A.

	Fase n-2	Fase n-1	Fase n
<b>Componente en el medio:</b>	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	1,000	1,000	1,000
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	50,000	50,000	50,000
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,110	0,110	0,110
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	12,000	12,000	12,000
<b>Componente en alimentación:</b>			
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	np	np	np
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	np	np	np

(np, no procede)

- 5 **Tabla 13: concentraciones de oligoelementos teóricas al comienzo de cada fase de cultivo para la modulación del crecimiento celular y la glucosilación de mAb: "no fucosilación/no fucosilación" (AA).** Concentraciones de cobre, manganeso, hierro y cinc usadas en el experimento de verificación con biorreactor 2, véase la configuración en la figura 12A.

	Fase n-2	Fase n-1	Fase n
<b>Componente en el medio:</b>	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	0,330	0,330	0,330
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	18,000	18,000	18,000
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,075	0,075	0,075
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	14,000	14,000	14,000
<b>Componente en alimentación:</b>			
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup></b>	np	np	np
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	np	np	np
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	np	np	np

10 (np, no procede)

15 Según lo previsto, el caso de prueba "AA" interfiere claramente con el crecimiento celular durante la serie de inoculación y la fase de producción como se muestra por la densidad celular viable y la integral con respecto al tiempo de células en la fase n (figura 12 C-D). Por otra parte, no se observó diferencia en la generación de biomasa para los casos de prueba "GG" y "GA" durante la expansión del cultivo celular y la fase de crecimiento celular en discontinuo. Se analizaron los efectos sobre la maduración de mAb por medición de abundancia de glucano. Para las especies de glucosilación de mAb maduras e inmaduras, se agruparon G1 y G2 o Man6, Man5 y G0-GlcNAc. Según lo previsto, el caso de prueba "GG" favorece la formación de especies de glucanos maduros (incremento de 1,4-7 veces en comparación con "AA" y "GA") (figura 12E) y los casos de prueba "GA" y "AA" soportan la formación de glucanos inmaduros (incremento de 2-3 veces en comparación con "GG") (figura 12F).

25 En resumen, el procedimiento descrito permite la modulación de las glucoproteínas, y en particular la maduración de la glucosilación de mAb, por el equilibrio de oligoelementos seleccionados usando un procedimiento de producción biotecnológico. Al cambiar de condiciones de "biomasa" a "glucosilación" usando estrategias de modulación para la concentración y proporción de cinc, cobre, hierro y manganeso, el procedimiento cumple los requisitos para un procedimiento económico de alto valor.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para la producción de una glucoproteína recombinante en condiciones de cultivo de fermentación en una célula eucariota, comprendiendo el procedimiento ajustar las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo durante el cultivo para afectar a la generación de biomasa y/o madurez de N-glucano en la glucoproteína expresada en el que el ajuste es:
- 10 - incrementar la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso para incrementar la biomasa, en el que las concentraciones se ajustan a:
- (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;
- (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;
- 15 (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ ; y/o
- 20 - incrementar la concentración de cada uno de cinc y manganeso y, opcionalmente, disminuir la concentración de cada uno de hierro y cobre para incrementar la madurez de N-glucano en la glucoproteína expresada, en el que la porción de hidratos de carbono de la glucoproteína expresada tiene una estructura G0, G1 o G2; o
- 25 - (i) disminuir la concentración de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso para incrementar la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras o (ii) incrementar la concentración de cada uno de cobre y hierro y disminuir la concentración de cada uno de cinc y manganeso para incrementar la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras;
- 30 en el que se logra una disminución en la concentración de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo complejando el hierro, cobre, cinc y manganeso con un quelante y/o sembrando las células en un medio recién preparado que contiene una reducción en la concentración de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en comparación con el medio de la fase de cultivo inmediatamente precedente.
- 35 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glucoproteína expresada es una glucoproteína N-glucosilada madura, una glucoproteína no fucosilada madura o una glucoproteína no fucosilada inmadura.
- 40 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que para incrementar la madurez de N-glucano en la glucoproteína expresada, las concentraciones se ajustan a:
- (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ;
- (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ ;
- (c) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- 45 (d) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .
- 50 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que para incrementar la madurez de N-glucano en la glucoproteína expresada, las concentraciones se ajustan a:
- (a) cinc: de 20  $\mu\text{M}$  a más de 50  $\mu\text{M}$ ; y
- (b) manganeso: de 0,01  $\mu\text{M}$  a más de 3  $\mu\text{M}$ .
- 55 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que para incrementar la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras, las concentraciones se ajustan a:
- (i)
- 60 (a) hierro: de 0  $\mu\text{M}$  a 35  $\mu\text{M}$ ;
- (b) cobre: de 0  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ;
- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y
- 65 (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ ; o bien



- (ii)
- (a) hierro: de 15  $\mu\text{M}$  a más de 80  $\mu\text{M}$ ;
- 5 (b) cobre: de 0,3  $\mu\text{M}$  a más de 2,5  $\mu\text{M}$ ;
- (c) cinc: de 0  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; y
- 10 (d) manganeso: de 0  $\mu\text{M}$  a 0,01  $\mu\text{M}$ .
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la glucoproteína es exógena o endógena a la célula eucariota, opcionalmente en el que la glucoproteína es una glucoproteína estructural, hormona, anticuerpo o enzima.
- 15 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la glucoproteína es un anticuerpo, opcionalmente en el que el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico o diagnóstico, opcionalmente un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la célula eucariota es una célula de mamífero, una célula de levadura o una célula de insecto.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las concentraciones de hierro, cobre, cinc y manganeso se ajustan durante las fases de cultivo de crecimiento y/o producción.
- 25 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se logra un incremento en la concentración de cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo complementando el medio en el que se cultivan las células y/o dividiendo las células en un medio recién preparado complementado con cualquiera o todos de hierro, cobre, cinc y manganeso.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las concentraciones de cada uno de hierro, cobre, cinc y manganeso en el medio de cultivo se ajustan durante el cultivo en primer lugar para favorecer la generación de biomasa y a continuación para incrementar la madurez de N-glucano en N-glucoproteínas expresadas, o para incrementar la producción de glucoproteínas no fucosiladas inmaduras.

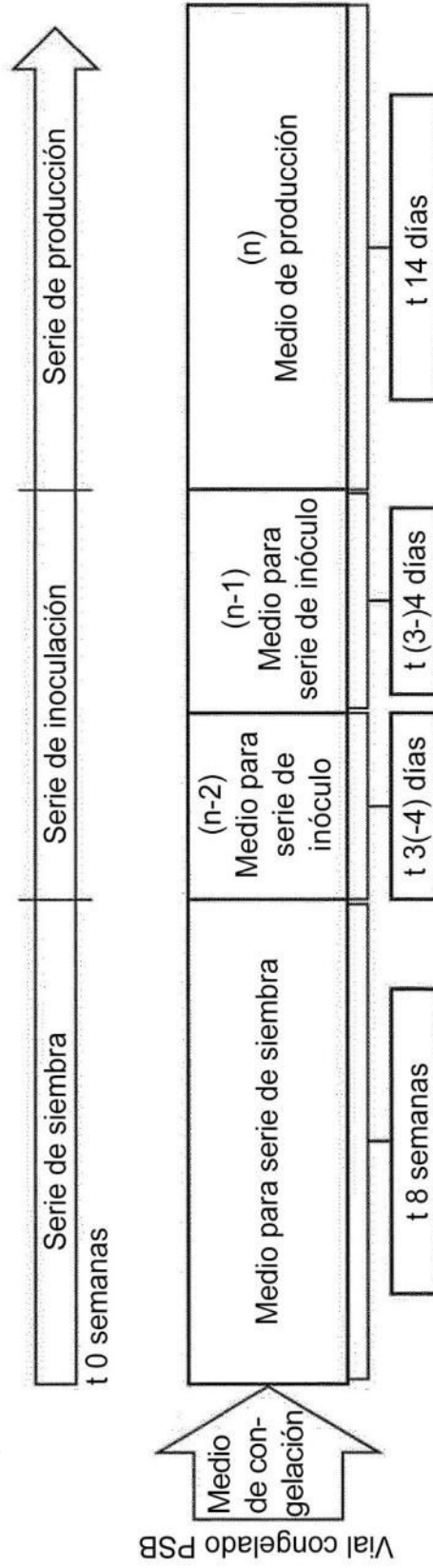


FIG. 1

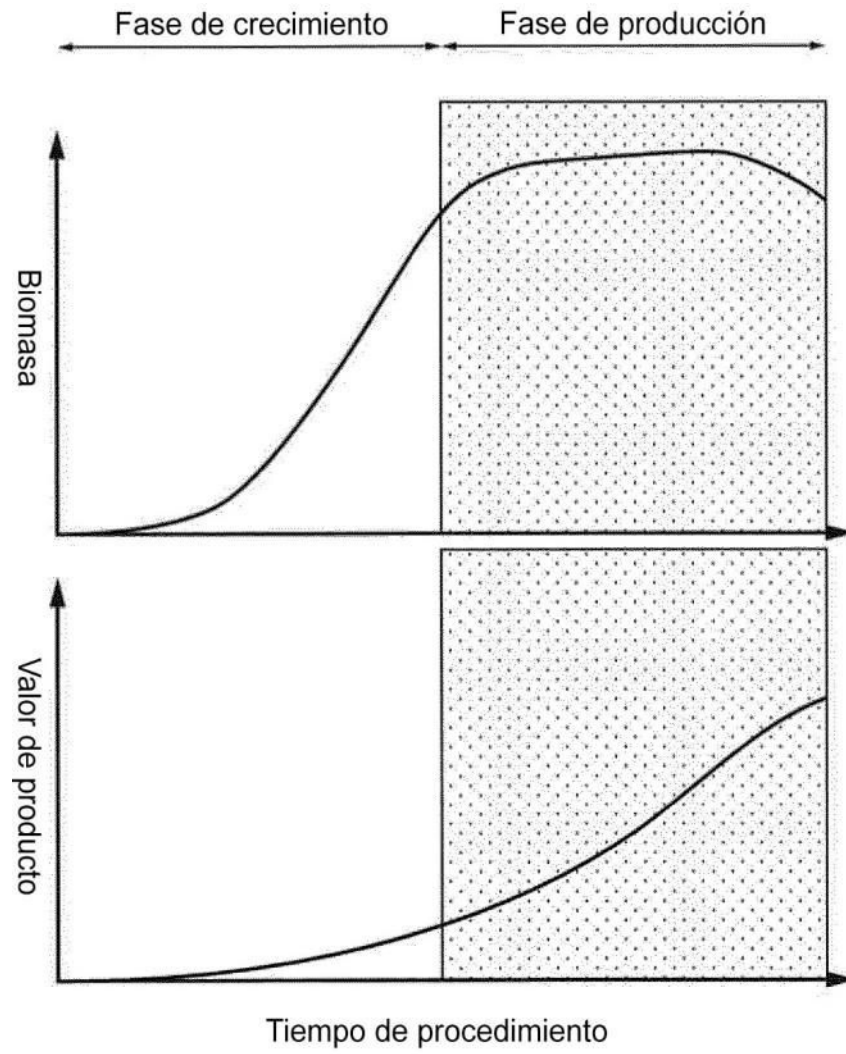


FIG. 2

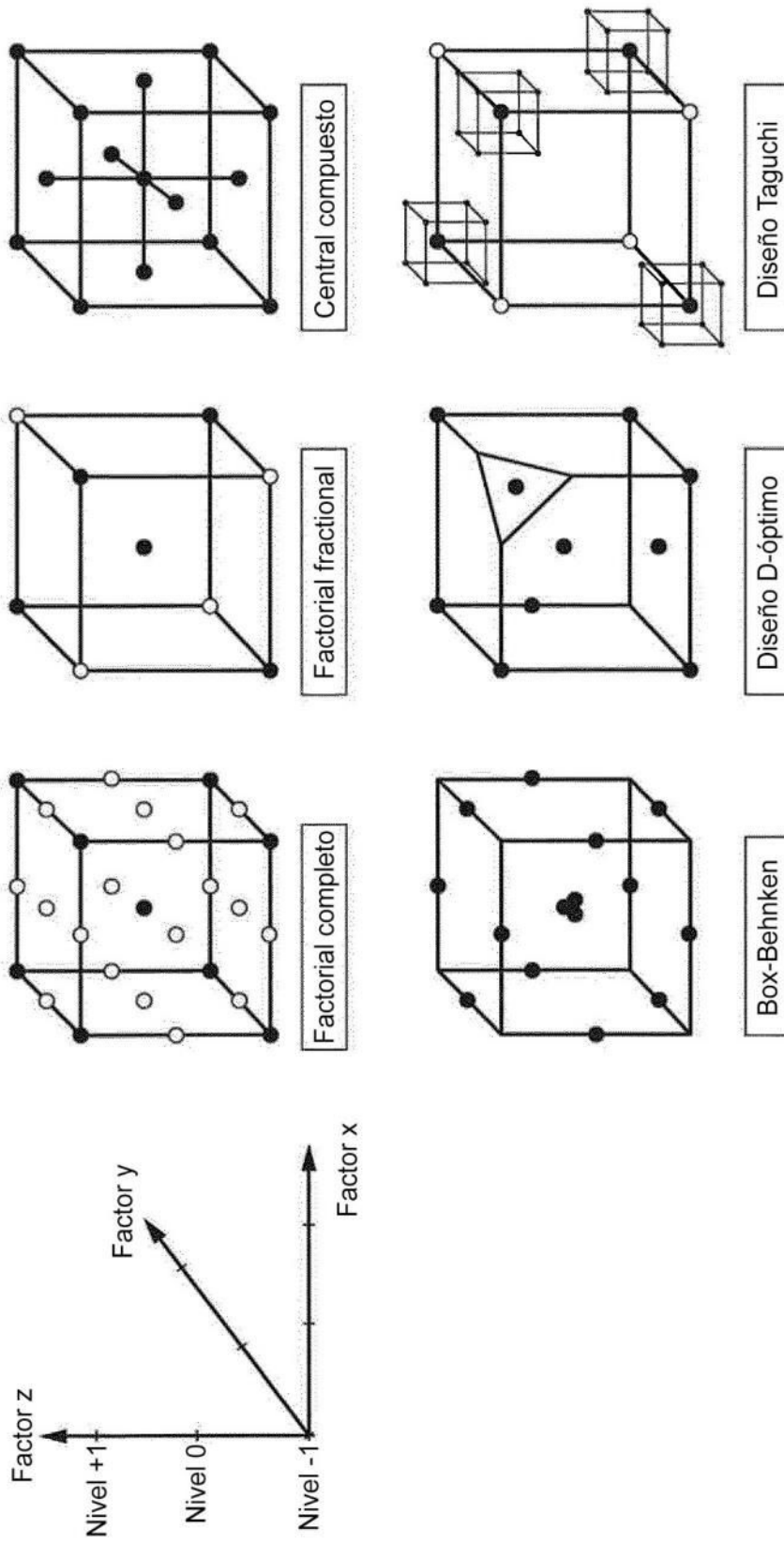


FIG. 3

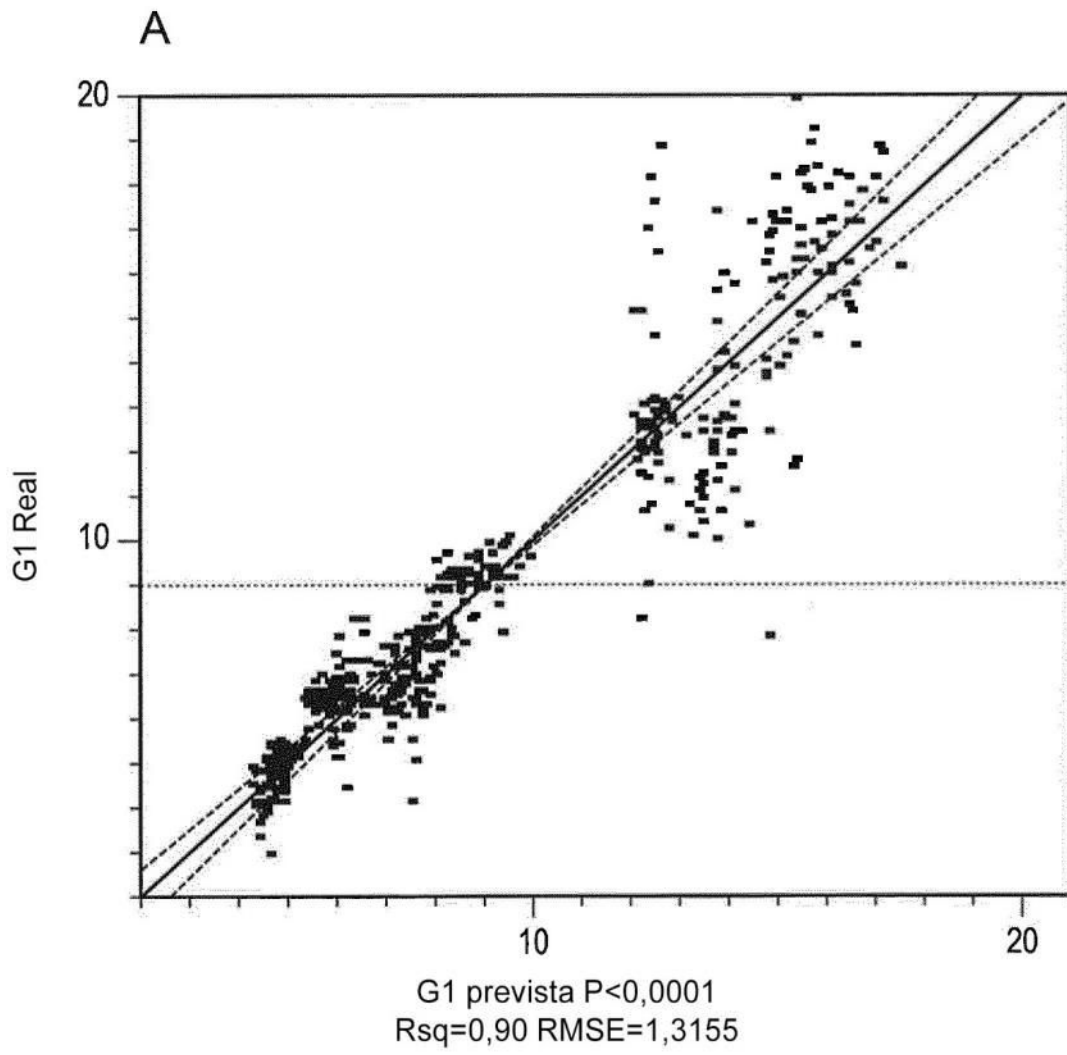


FIG. 4

**B**

Estimaciones escaladas

Factores nominales expandidos para todos los niveles

Factores continuos centrados por media, escalado por intervalo/2

Término	Escalado Estimación	Error Est.	Proporción t	Prob> t
Intersección	7,5468579	0,192689	39,17	<0,0001*
Placa[1]	-0,645483	0,144044	-4,48	<0,0001*
Placa[2]	-0,594215	0,145802	-4,08	<0,0001*
Placa[3]	-0,522473	0,148566	-3,52	0,0005*
Placa[4]	-0,291317	0,144044	-2,02	0,0437*
Placa[5]	1,0248815	0,145743	7,03	<0,0001*
Placa[6]	0,6463246	0,146707	4,41	<0,0001*
Placa[7]	0,3822824	0,150661	2,54	0,0115*
Clon[1]	0	0	0,00	1,0000
Clon[3]	0	0	0,00	1,0000
Día	-2,955056	0,159919	-18,48	<0,0001*
Aluminio	-0,089947	0,067986	-1,32	0,1865
Molibdeno	0,1175024	0,067359	1,74	0,0817
Bario	0,085942	0,067347	1,28	0,2026
Cromo	0,0518704	0,067606	0,77	0,4433
Bromo	-0,013796	0,66447	-0,21	0,8356
Yodo	0,1141258	0,06765	1,69	0,0923
Cobre	-0,187321	0,067638	-2,77	0,0058*
Manganeso	1,3656831	0,067168	20,33	<0,0001*
Rubidio	0,1045994	0,068002	1,54	0,1247
Plata	-0,061647	0,066229	-0,93	0,3524
Cinc	0,0951202	0,066402	1,43	0,1527
Estaño	0,0541508	0,067361	0,80	0,4219
Circonio (día-10,7361)* (día-10,7361)	-0,060032 1,9508852	0,067283 0,242891	-0,89 8,03	0,3727 <0,0001*

FIG. 4 (continuación)

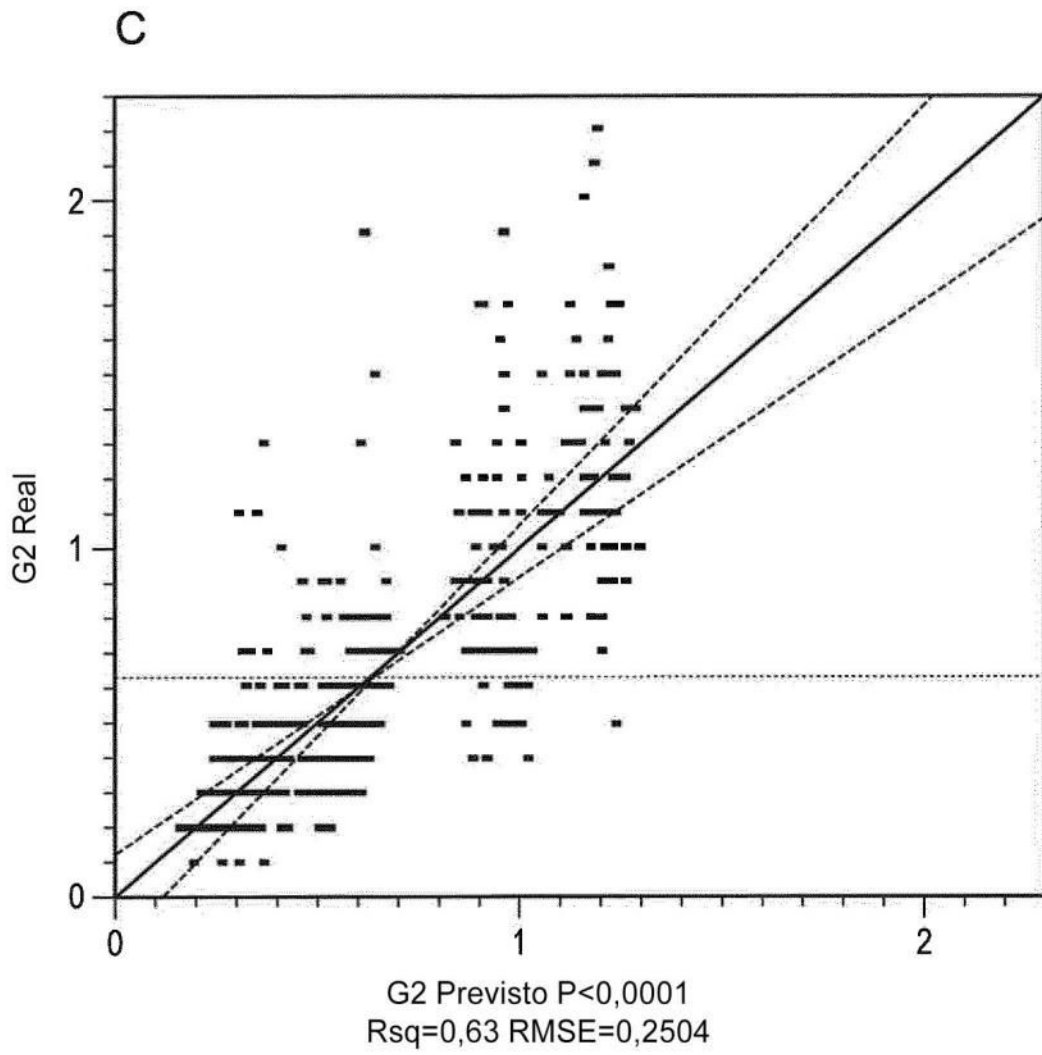


FIG. 4 (continuación)

D

Estimaciones escaladas

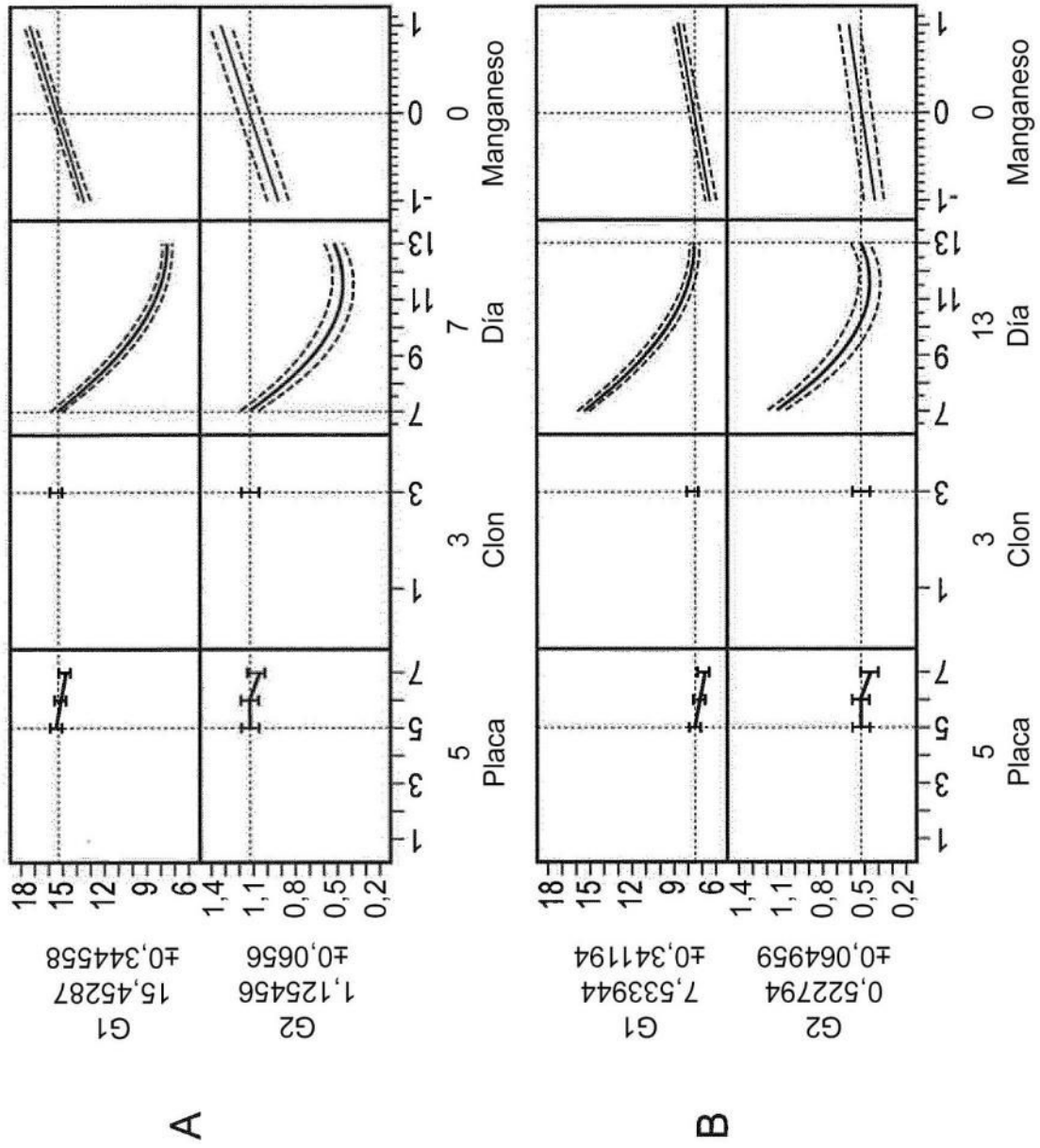
Factores nominales expandidos para todos los niveles

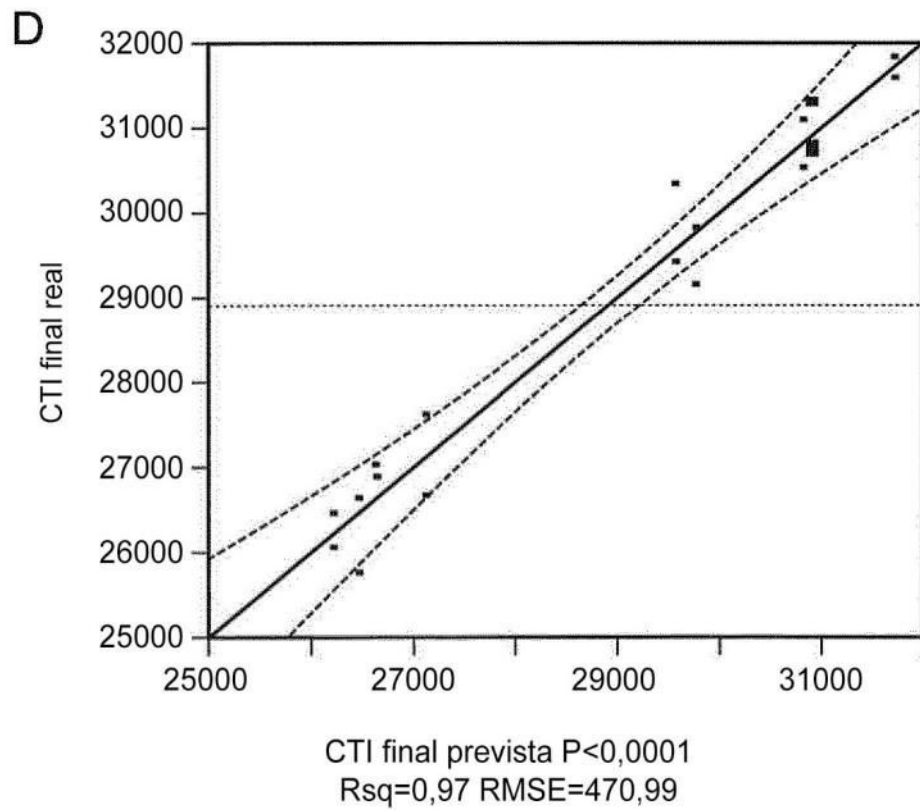
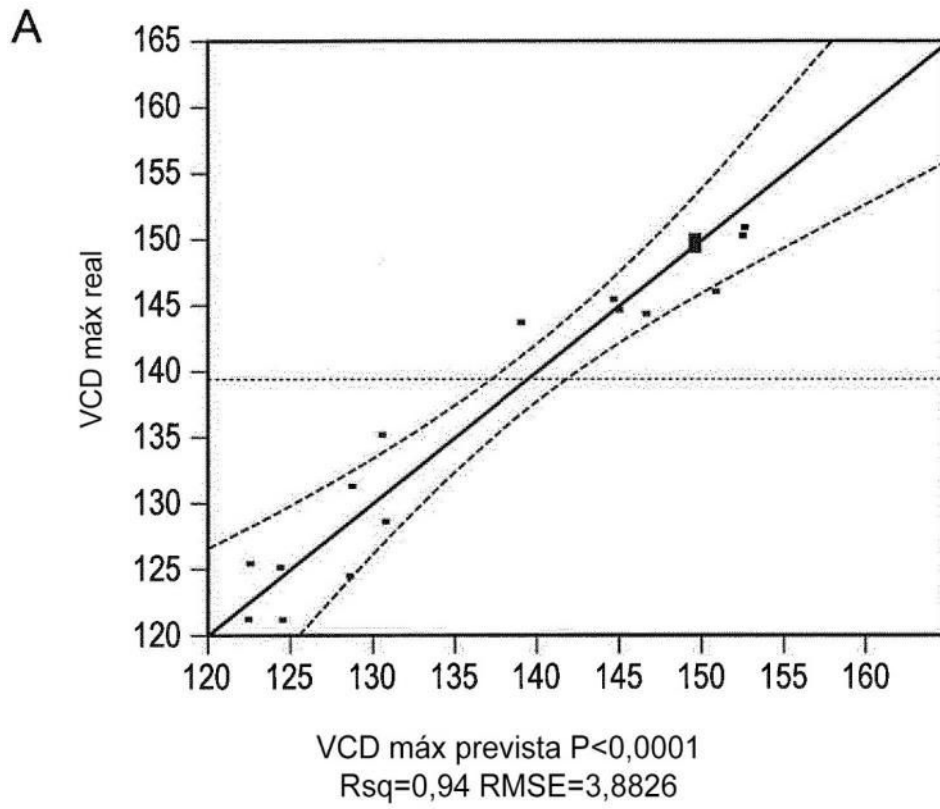
Factores continuos centrados por media, escalado por intervalo/2

Término	Escalado Estimación		Error Est.	Proporción t	Prob> t
Intersección	0,4188584		0,036673	11,42	<0,0001*
Placa[1]	-0,005623		0,027415	-0,21	0,8376
Placa[2]	-0,052605		0,02775	-1,90	0,0586
Placa[3]	-0,058561		0,028276	-2,07	0,0389*
Placa[4]	0,0096544		0,027415	0,35	0,7249
Placa[5]	0,0565108		0,027738	2,04	0,0422*
Placa[6]	0,0533356		0,027922	1,91	0,0567
Placa[7]	-0,002712		0,028674	-0,09	0,9247
Clon[1]	0		0	0,00	1,0000
Clon[3]	0		0	0,00	1,0000
Día	-0,157669		0,030436	-5,18	<0,0001*
Aluminio	-0,01299		0,012939	-1,00	0,3159
Molibdeno	0,0007346		0,01282	0,06	0,9543
Bario	0,0071756		0,012818	0,56	0,5759
Cromo	0,0014852		0,012867	0,12	0,9082
Bromo	0,0036169		0,012646	0,29	0,7750
Yodo	0,0087184		0,012875	0,68	0,4987
Cobre	-0,011456		0,012873	-0,89	0,3740
Manganeso	0,1315323		0,012784	10,29	<0,0001*
Rubidio	0,0067806		0,012942	0,52	0,6006
Plata	-0,000594	0,012605	-0,05	0,9624	
Cinc	0,0136294	0,012638	1,08	0,2814	
Estaño	-0,015355	0,01282	-1,20	0,2317	
Circonio	-0,016528	0,012806	-1,29	0,1975	
(día-10,7361)*(día-10,7361)	0,2807794	0,046228	6,07	<0,0001*	

FIG. 4 (continuación)







**FIG. 6**

**B**

Término	Estimación	Error Est.	Proporción t	Prob> t
Hierro	11,12	0,970661	11,46	<0,0001*
Hierro*Hierro	-12,07417	2,442777	-4,94	0,0004*
Manganeso	3,05625	0,970661	3,15	0,0093*
Cinc*Hierro	2,395	0,970661	2,47	0,0313*
Hierro*Cobre	1,49625	0,970661	1,54	0,1515
Cinc	1,4175	0,970661	1,46	0,1722
Cobre	1,41375	0,970661	1,46	0,1732

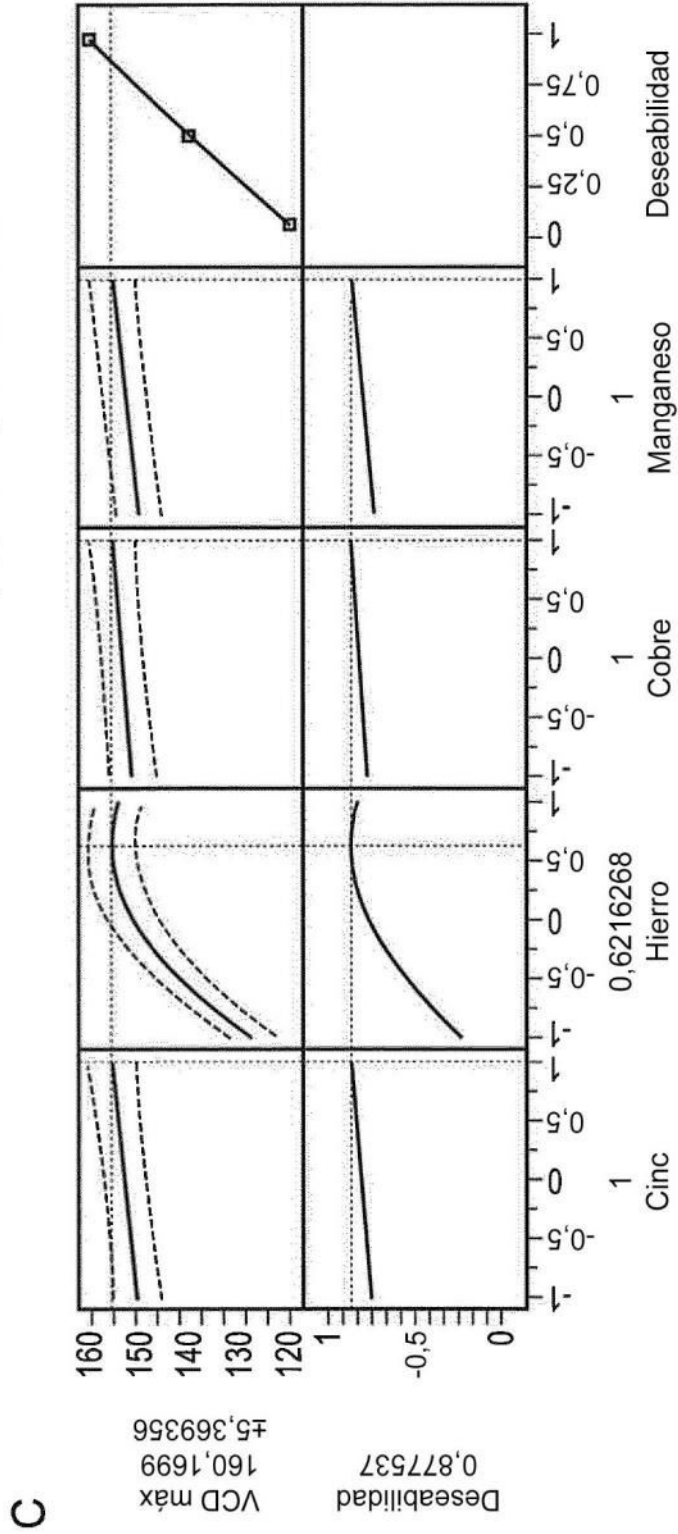
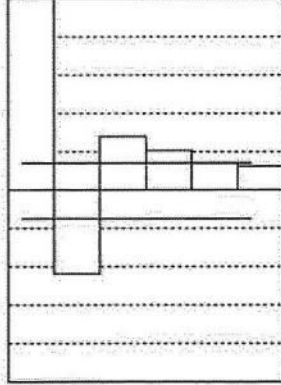


FIG. 6 (continuación)

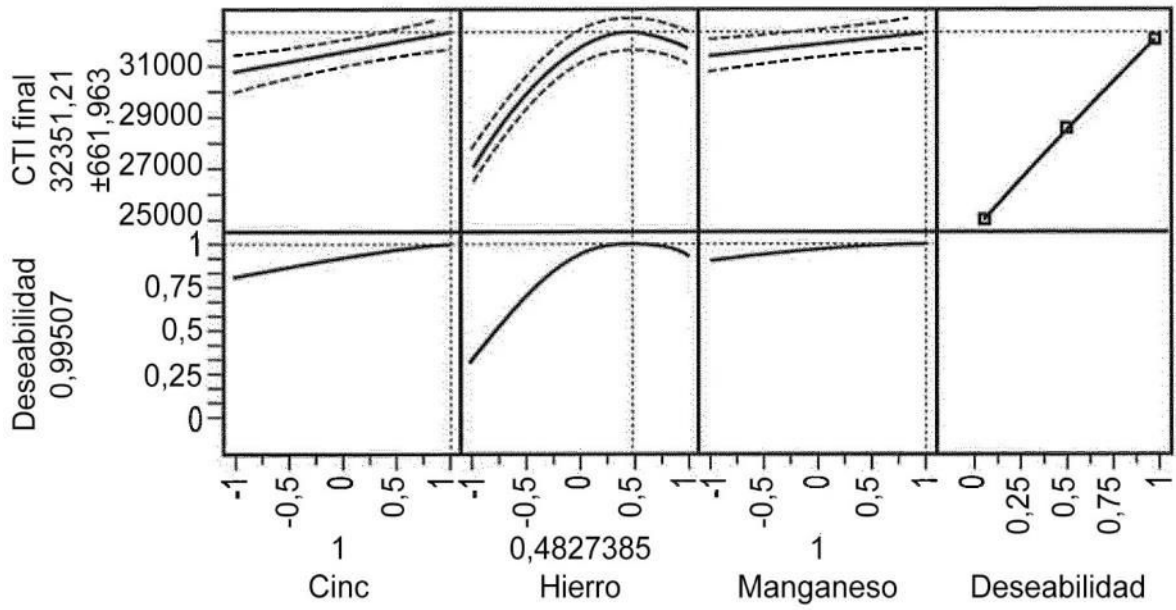
**E**

Término	Estimación	Error Est.	Proporción t	Prob> t
Hierro	1928,1563	117,7482	16,38	<0,0001*
Hierro*Hierro	-2378,123	296,3265	-8,03	<0,0001*
Cinc	425,515	117,7482	3,61	0,0036*
Cinc*Hierro	367,86625	117,7482	3,12	0,0088*
Manganeso	271,09875	117,7482	2,30	0,0400*
Cinc*Manganeso	174,75875	117,7482	1,48	0,1635

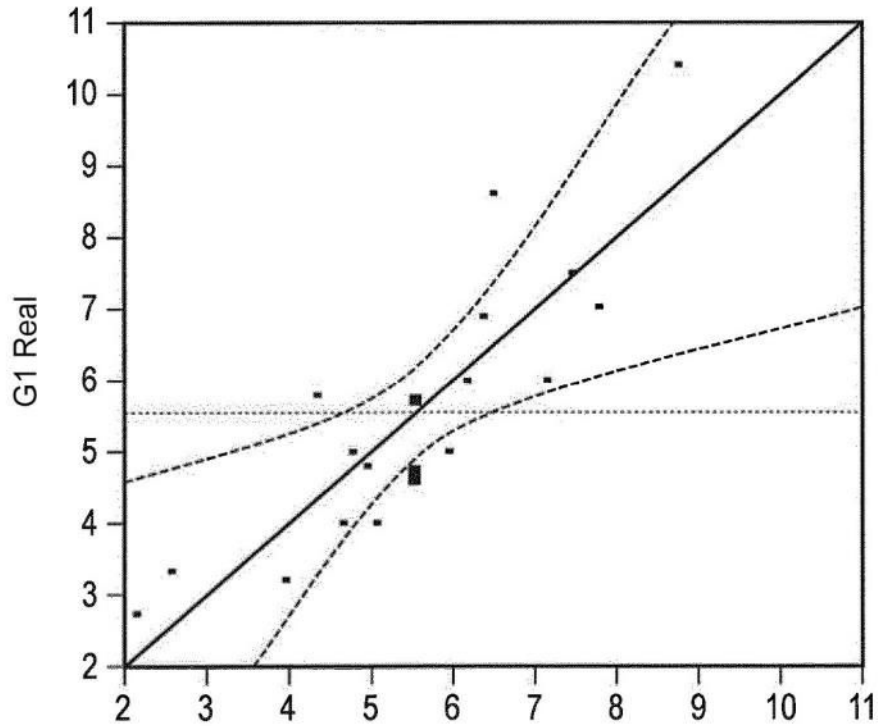


**FIG. 6** (continuación)

**F**



**G**



G1 Previsto P=0,0047  
Rsq=0,75 RMSE=1,1958

**FIG. 6** (continuación)

H

Término	Estimación	Error Est.	Proporción t	Prob> t
Cinc*Cobre	-1,05	0,29895	-3,51	0,0043*
Manganeso	1,0375	0,29895	3,47	0,0046*
Hierro	0,875	0,29895	2,93	0,0127*
Cinc	0,35	0,29895	1,17	0,2644
Hierro*Manganeso	-0,225	0,29895	-0,75	0,4662
Cobre	-0,1375	0,29895	-0,46	0,6538

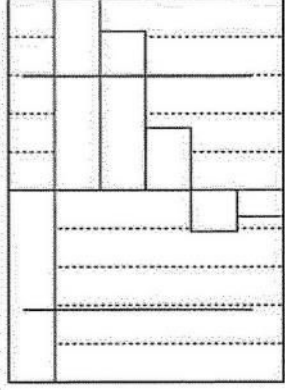


FIG. 6 (continuation)

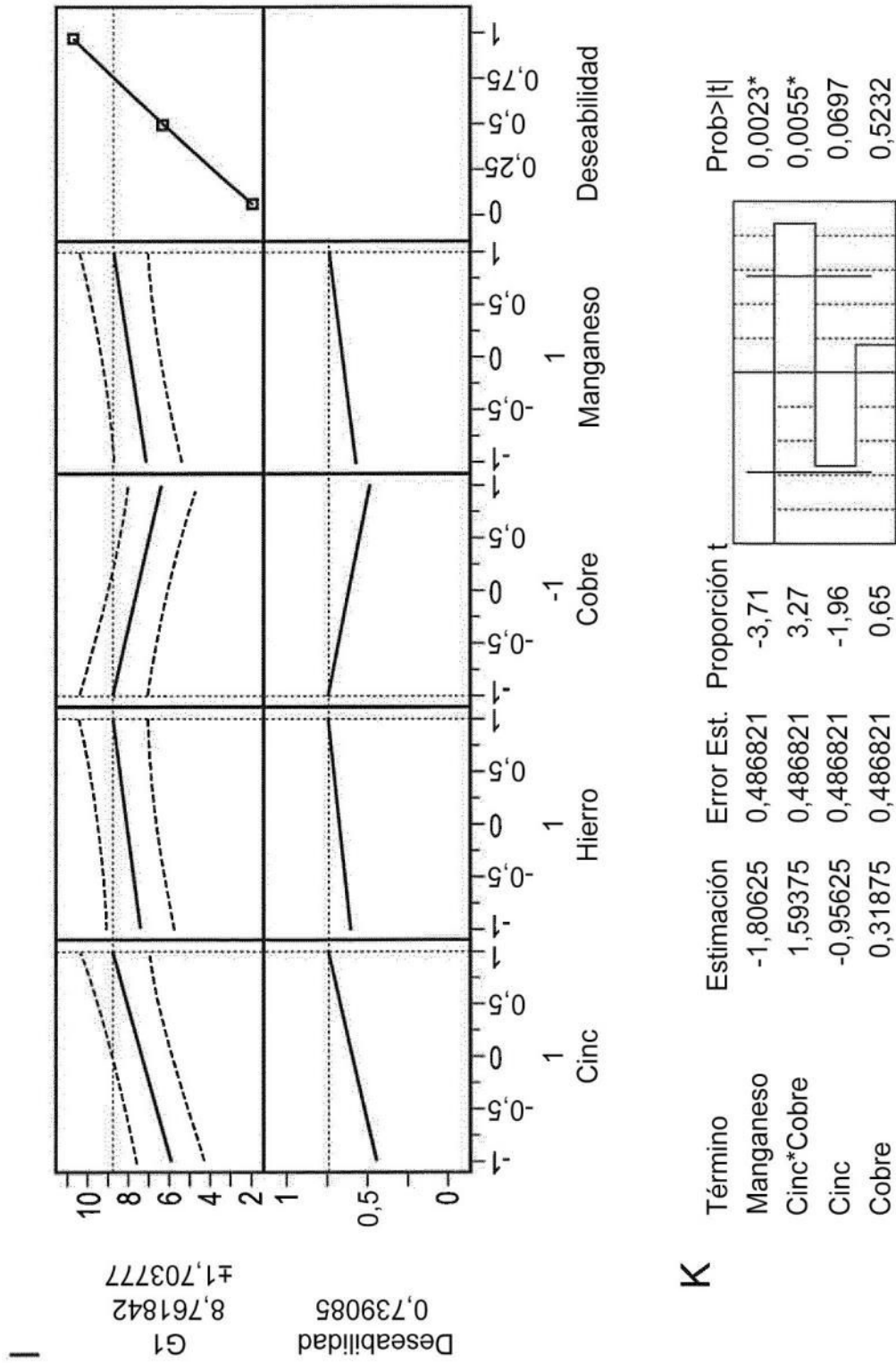


FIG. 6 (continuación)

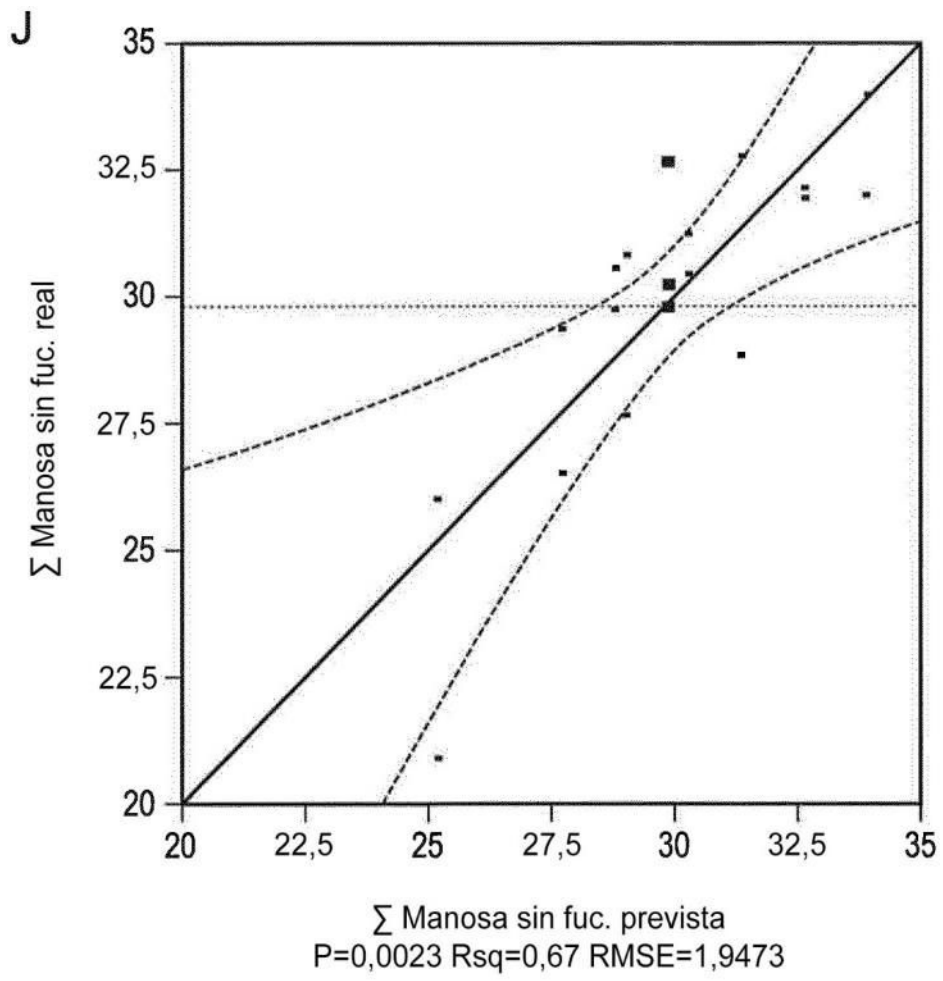


FIG. 6 (continuación)



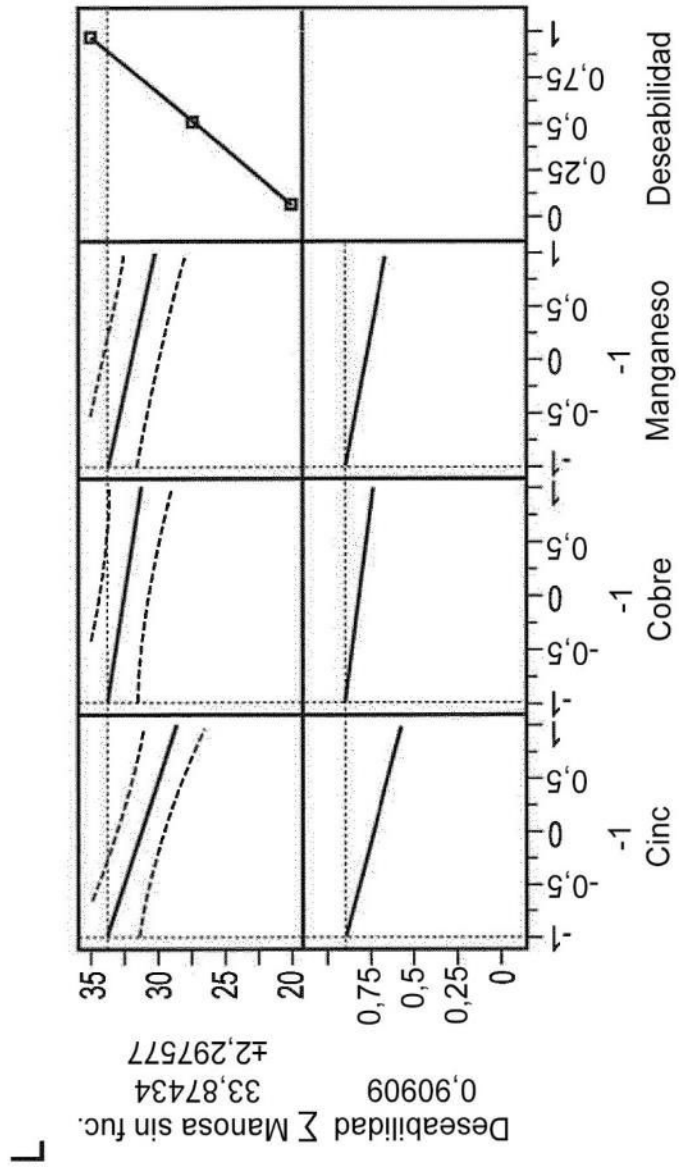
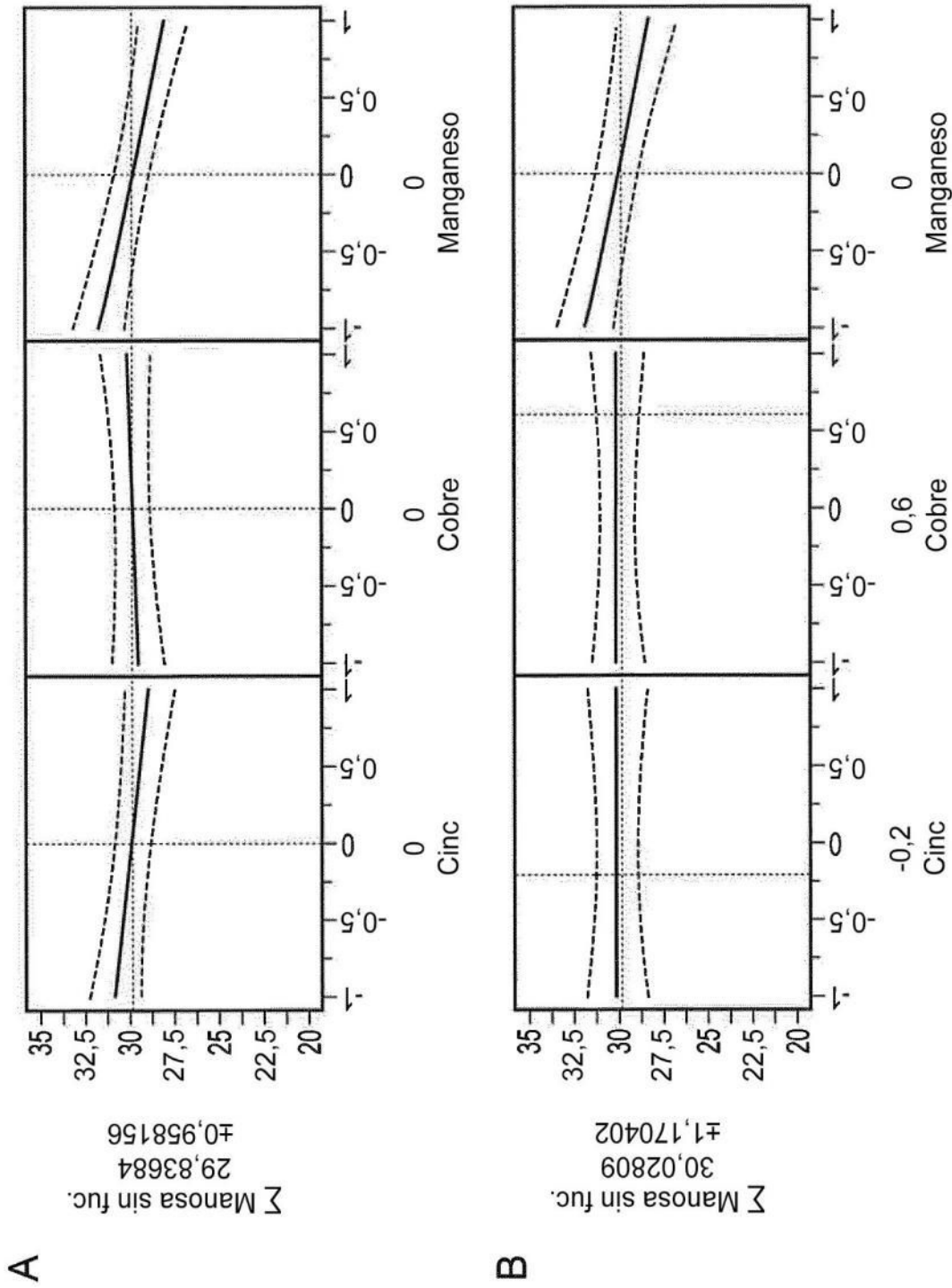


FIG. 6 (continuación)



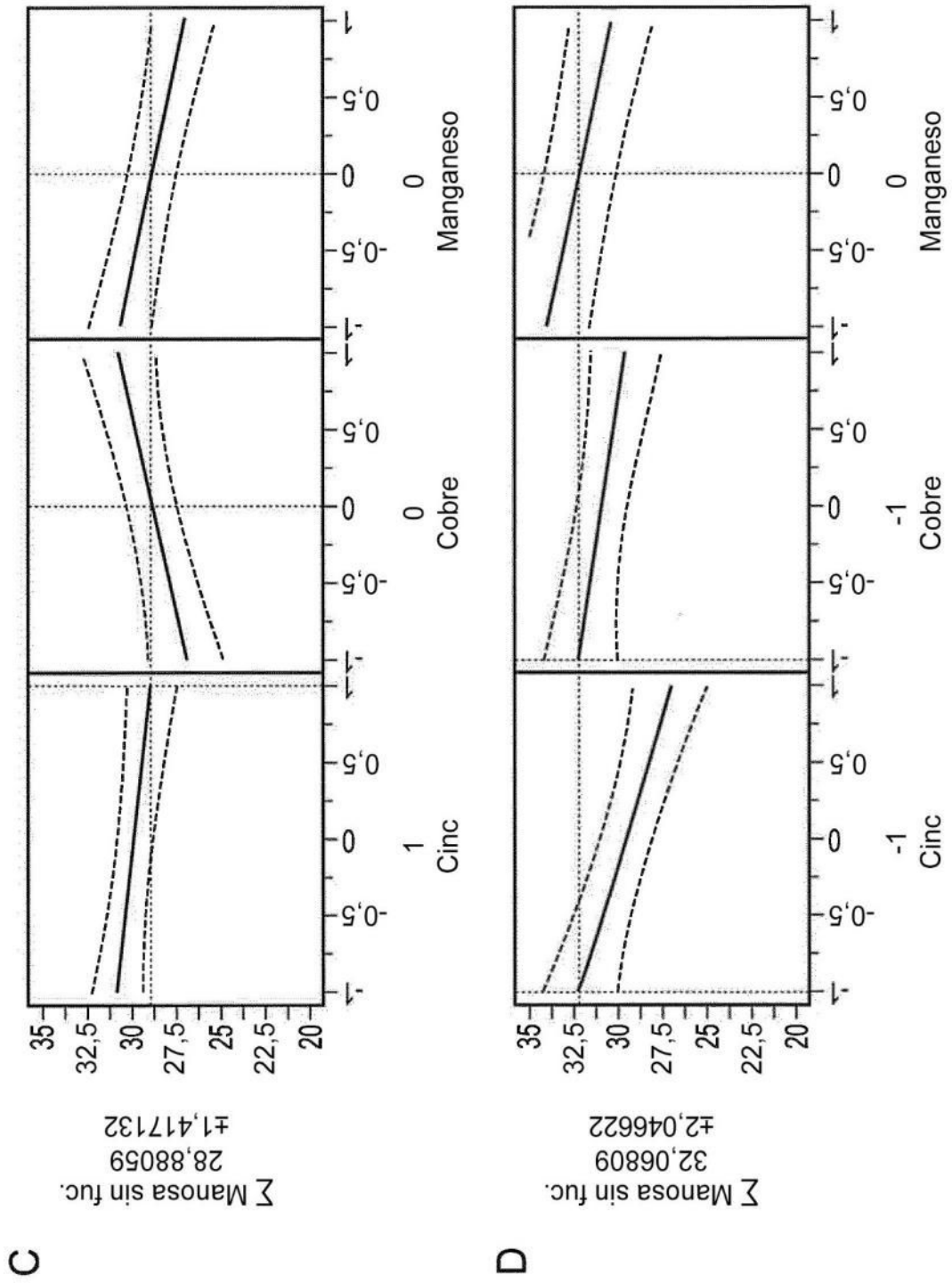


FIG. 7 (continuación)

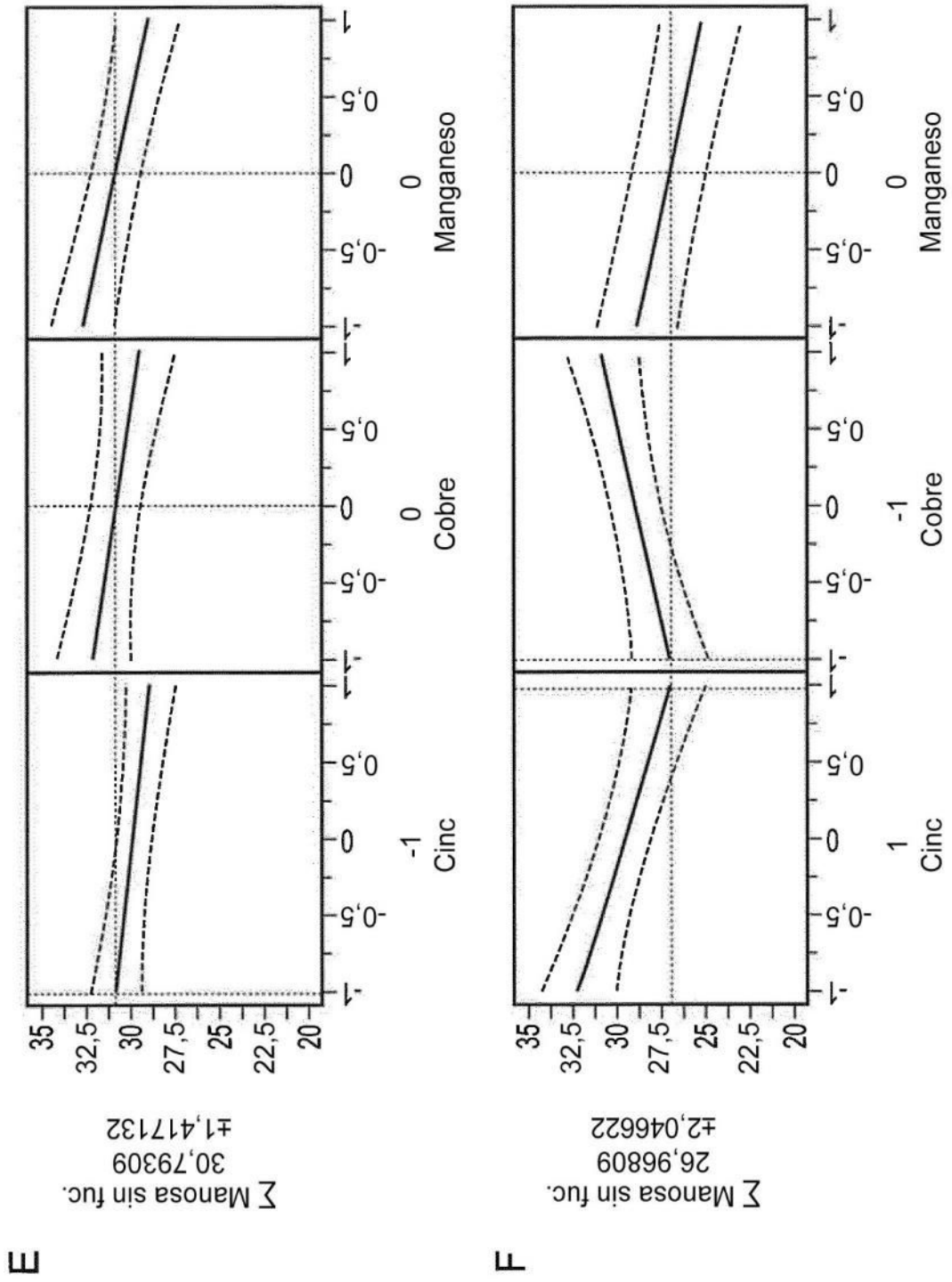


FIG. 7 (continuación)

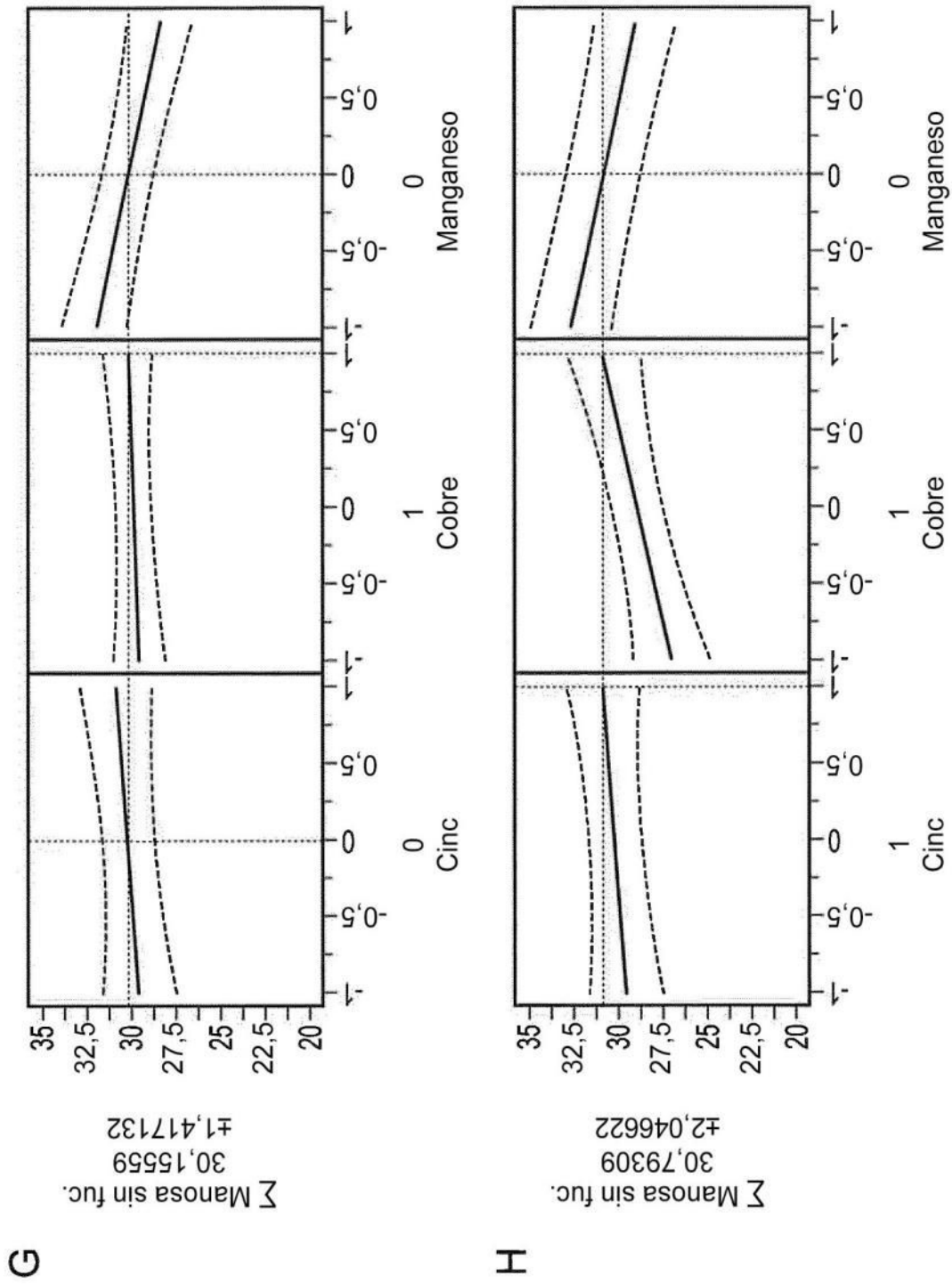


FIG. 7 (continuación)

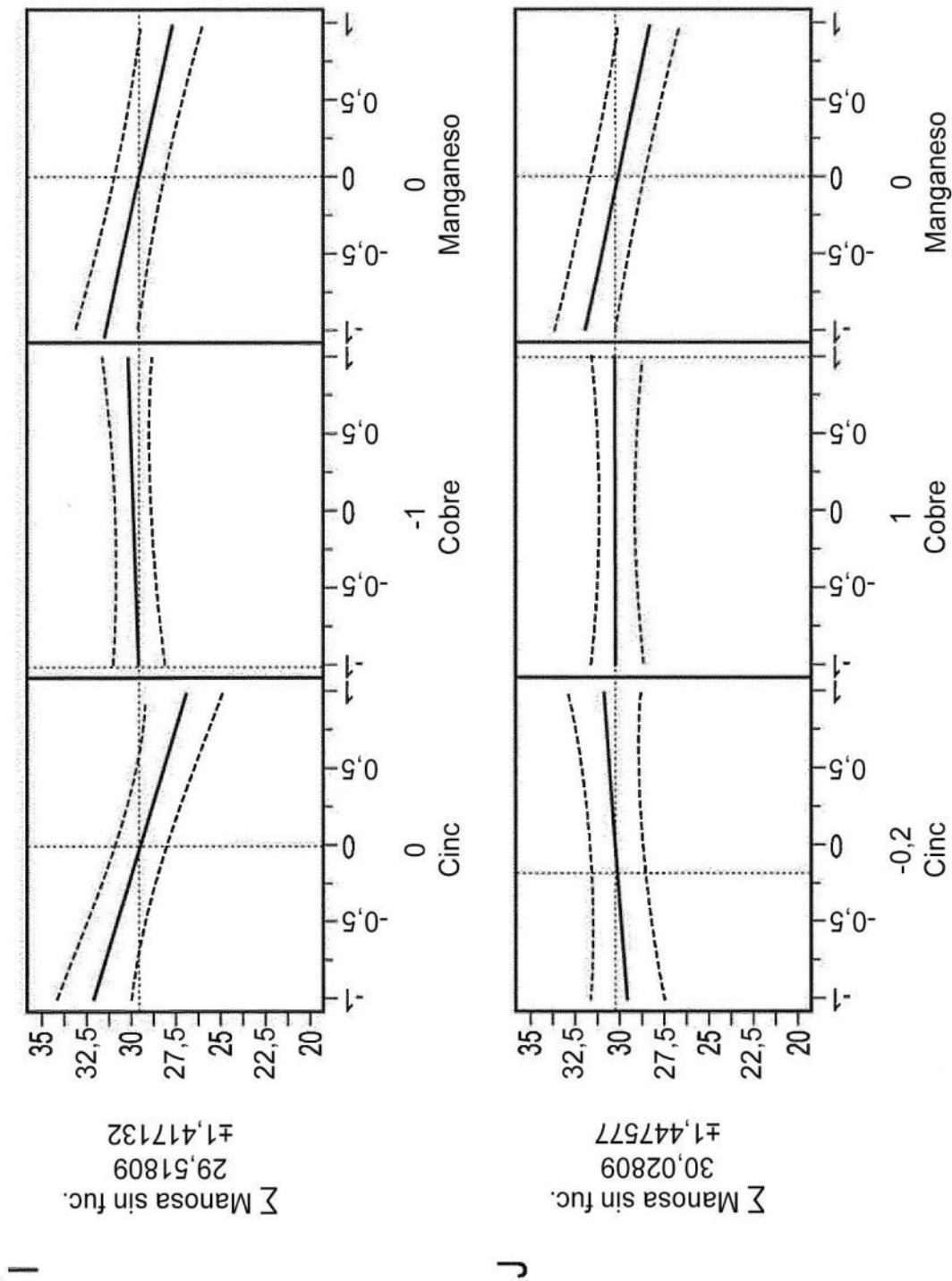
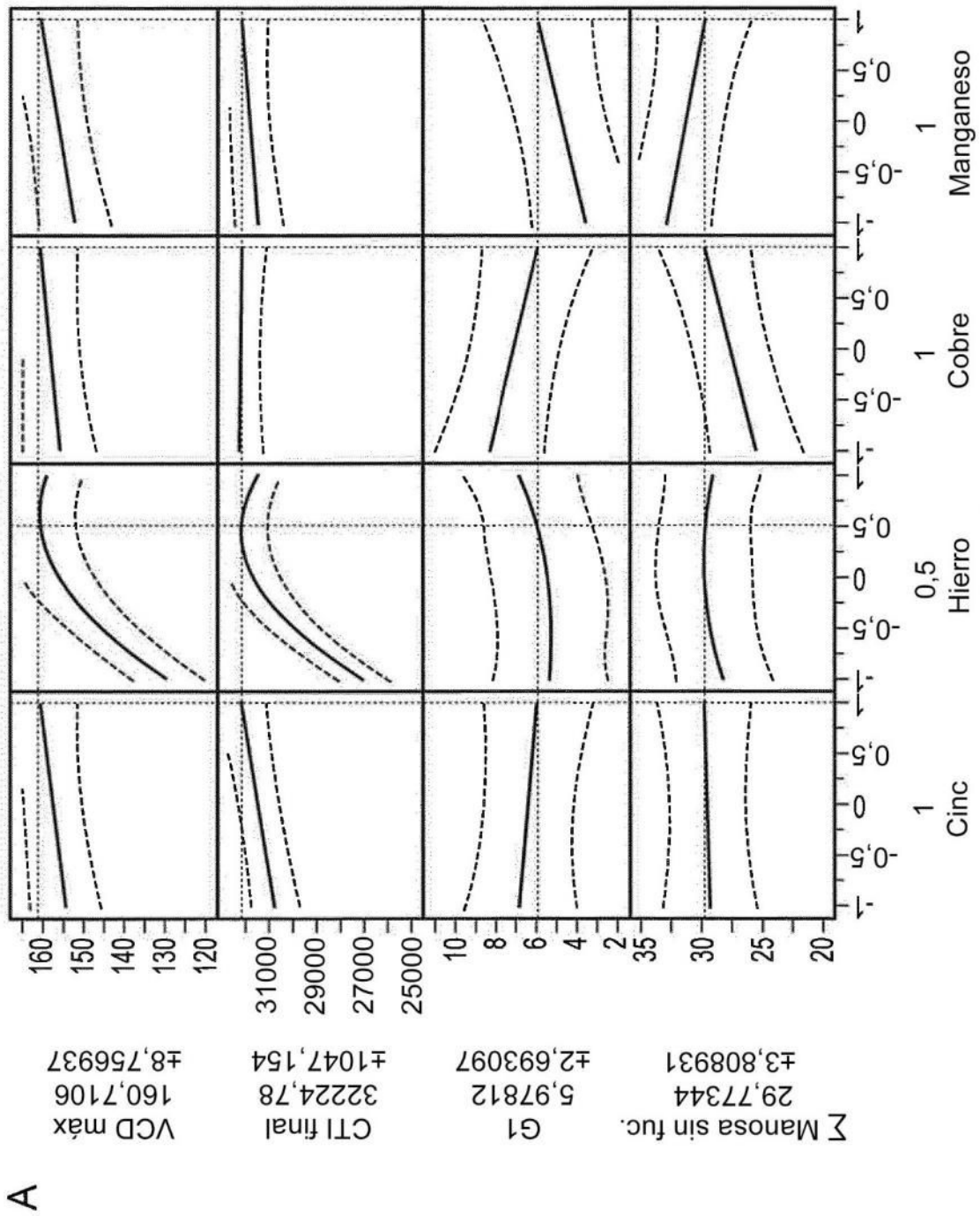


FIG. 7 (continuación)



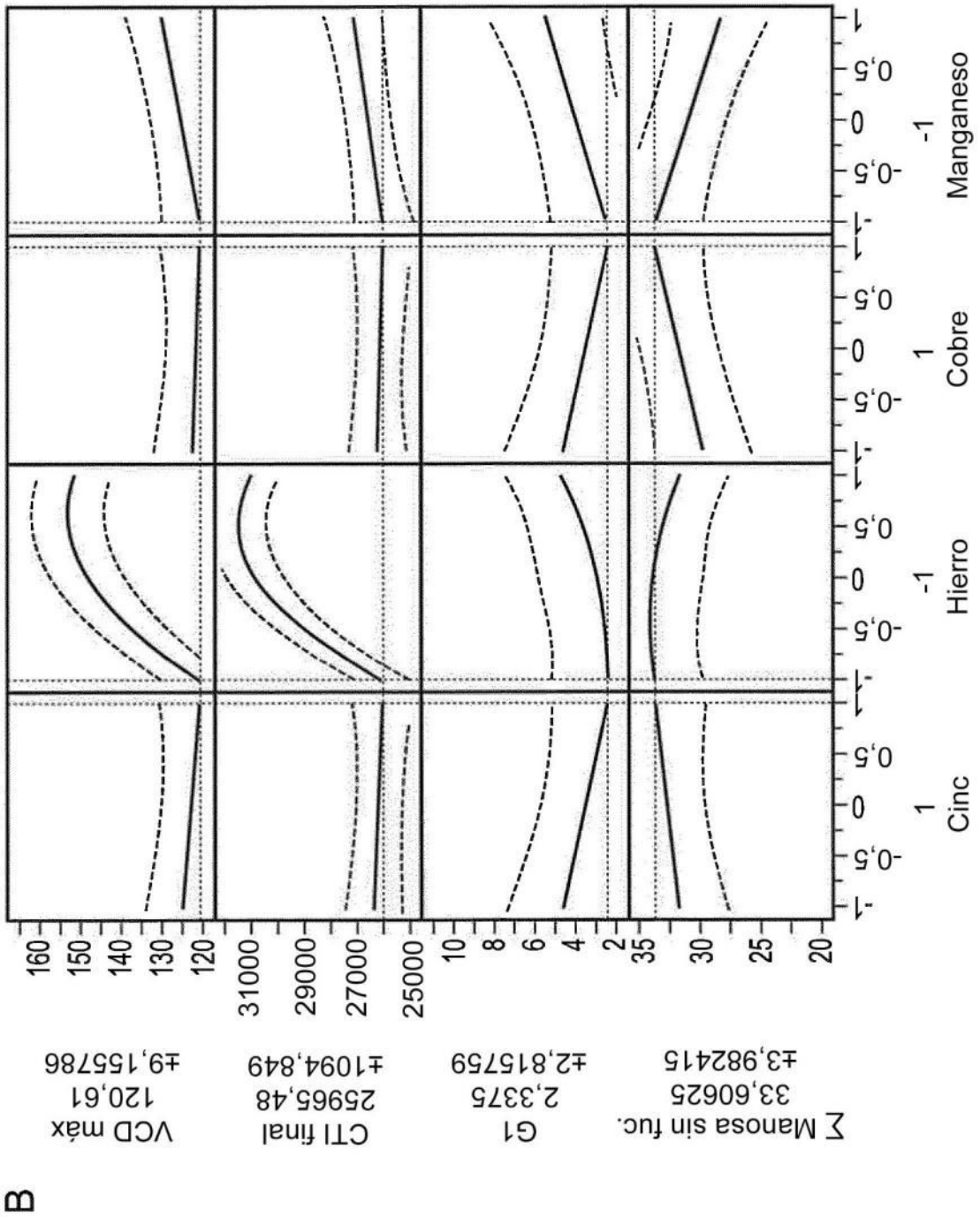


FIG. 8 (continuación)



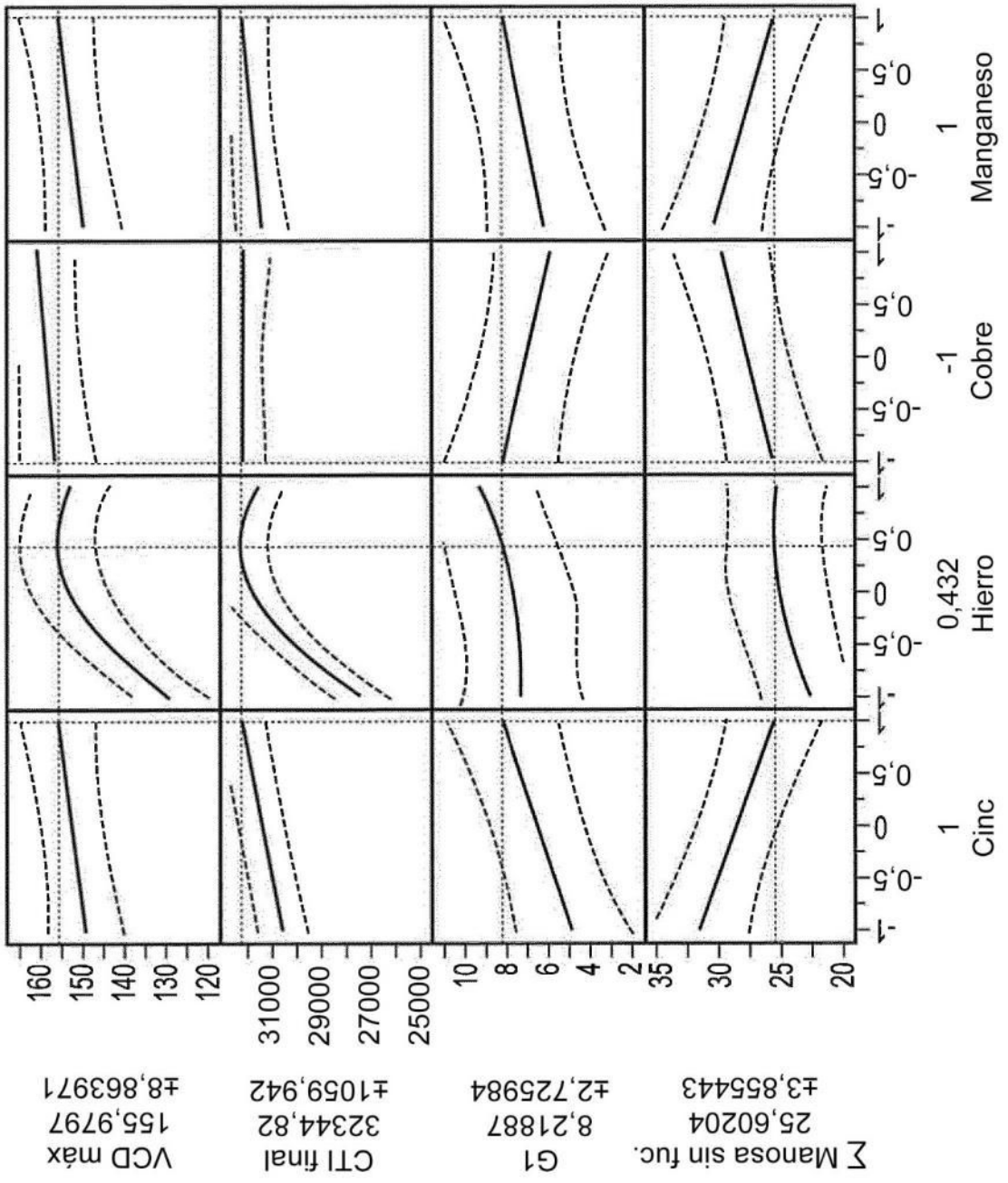


FIG. 8 (continuación)

C

Σ Manosa sin fuc. 25,60204 ±3,855443  
 G1 8,21887 ±2,725984  
 CTI final 32344,82 ±1059,942  
 VCD máx 155,9797 ±8,863971

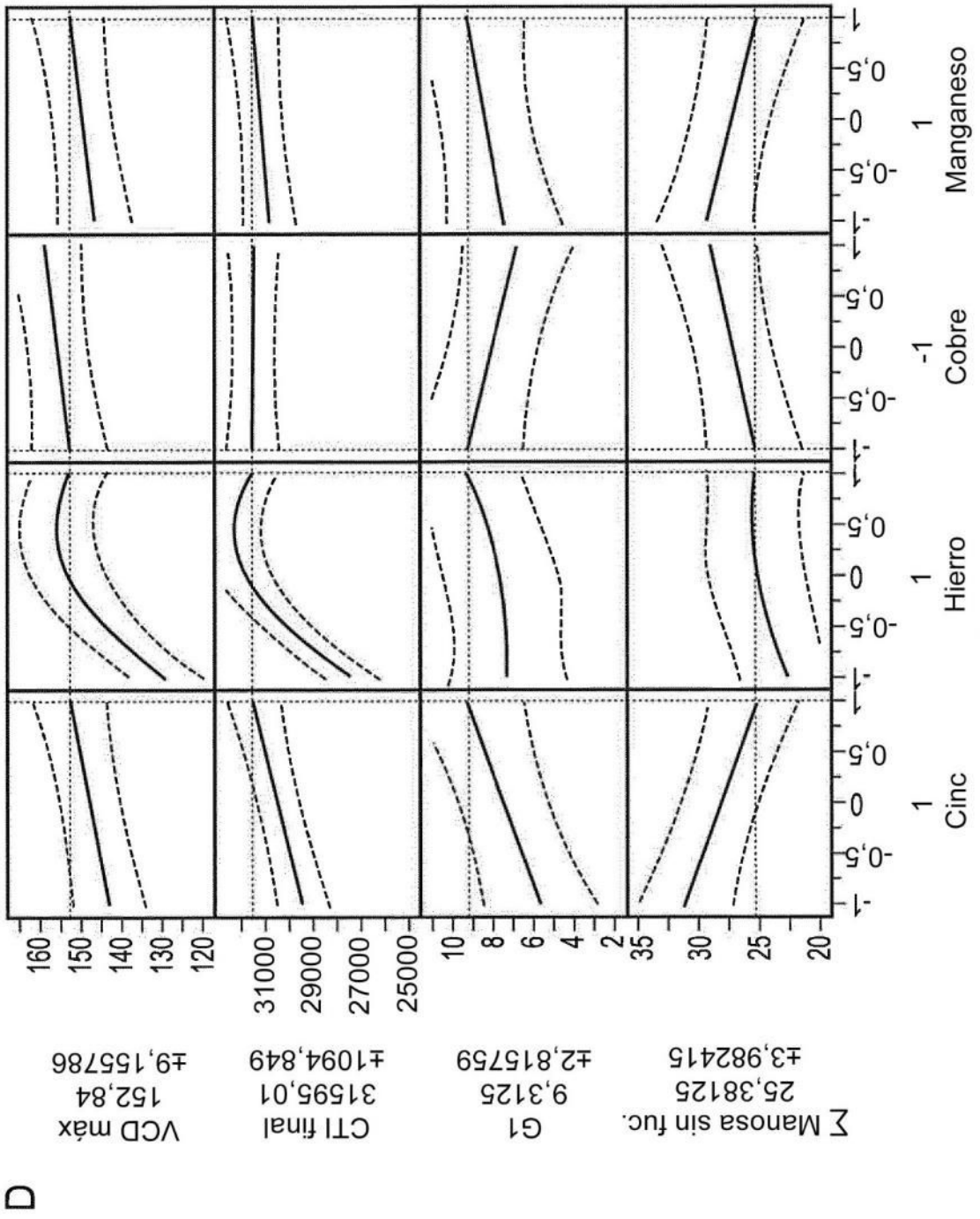


FIG. 8 (continuación)

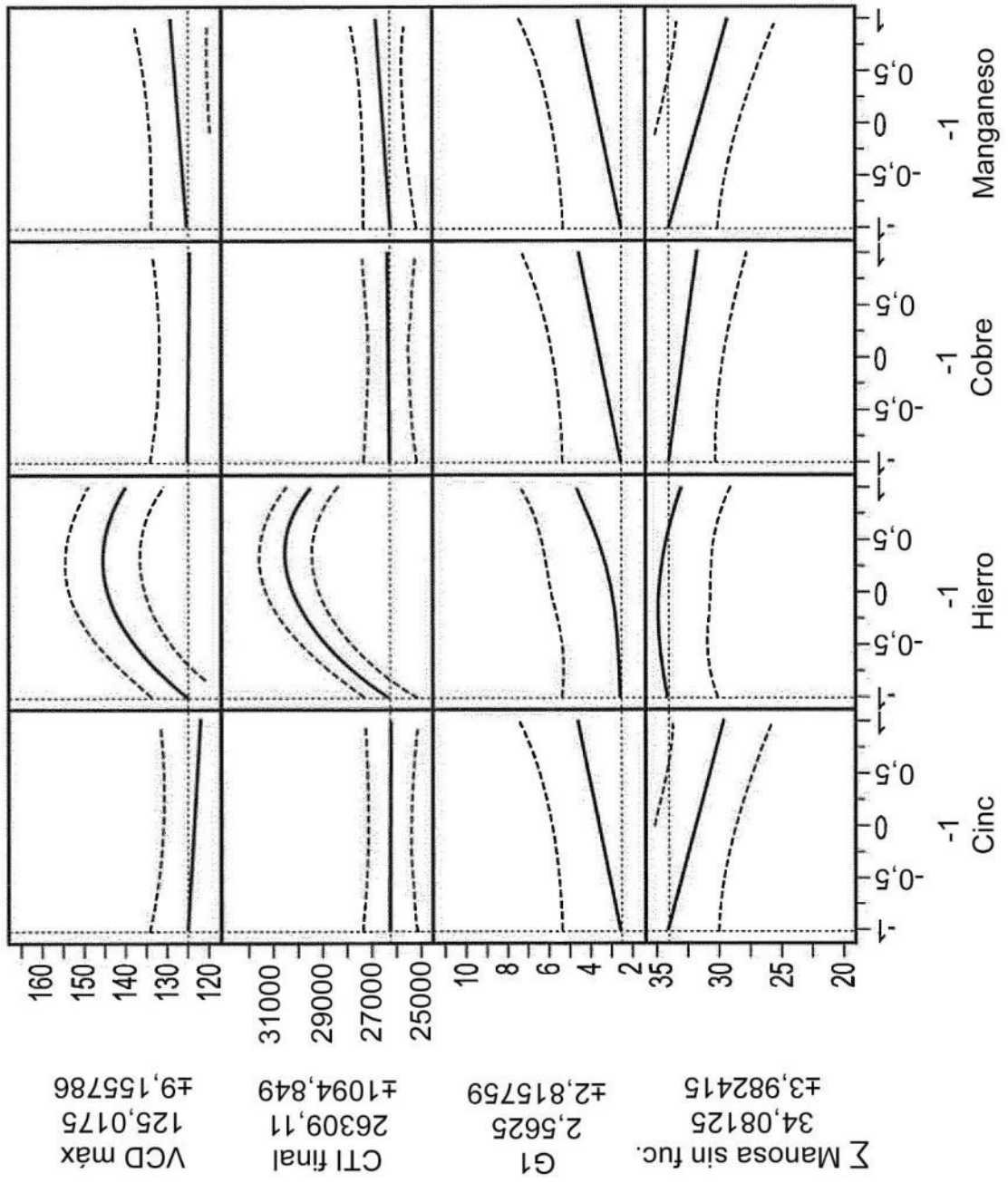


FIG. 8 (continuación)

E

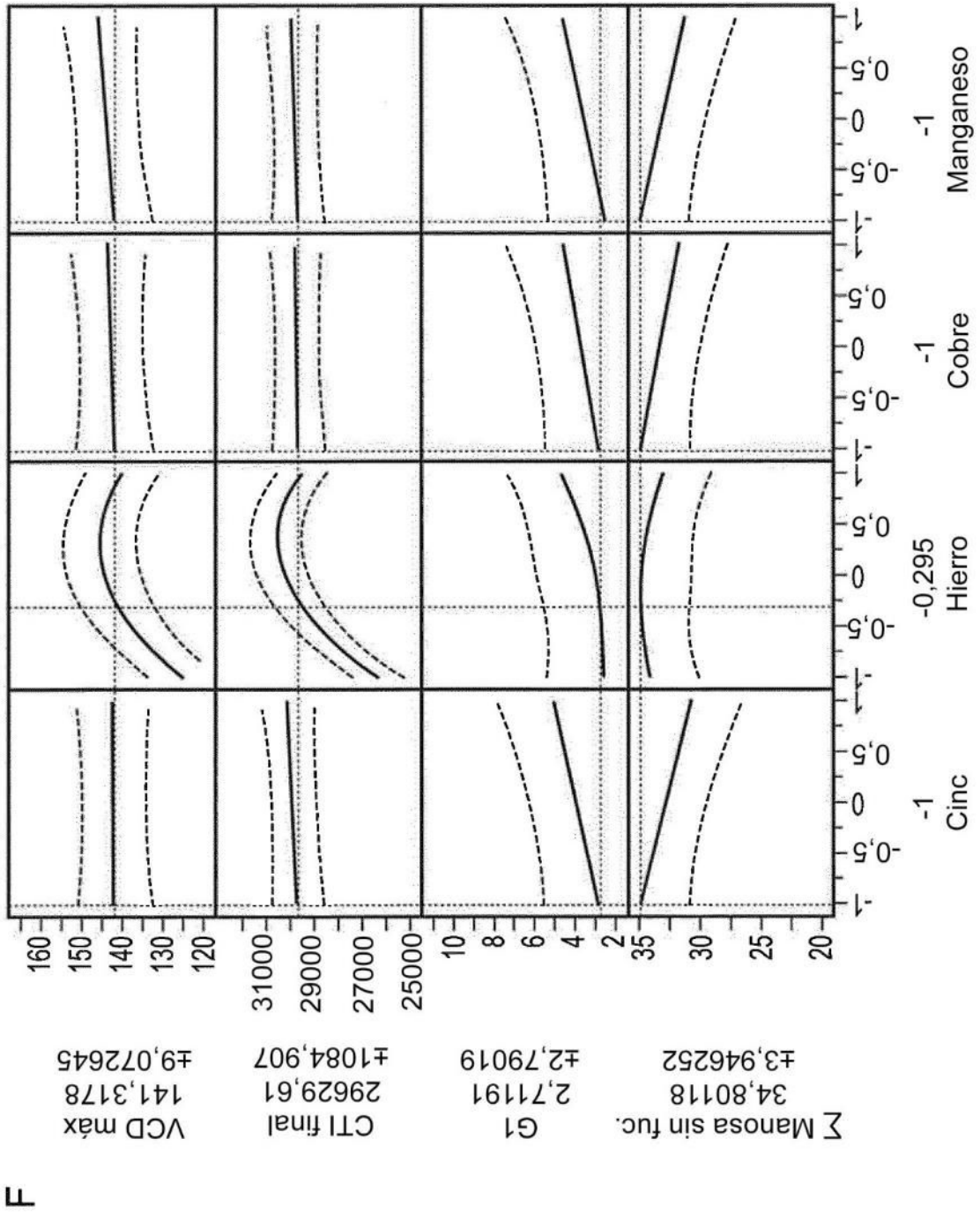


FIG. 8 (continuación)

F

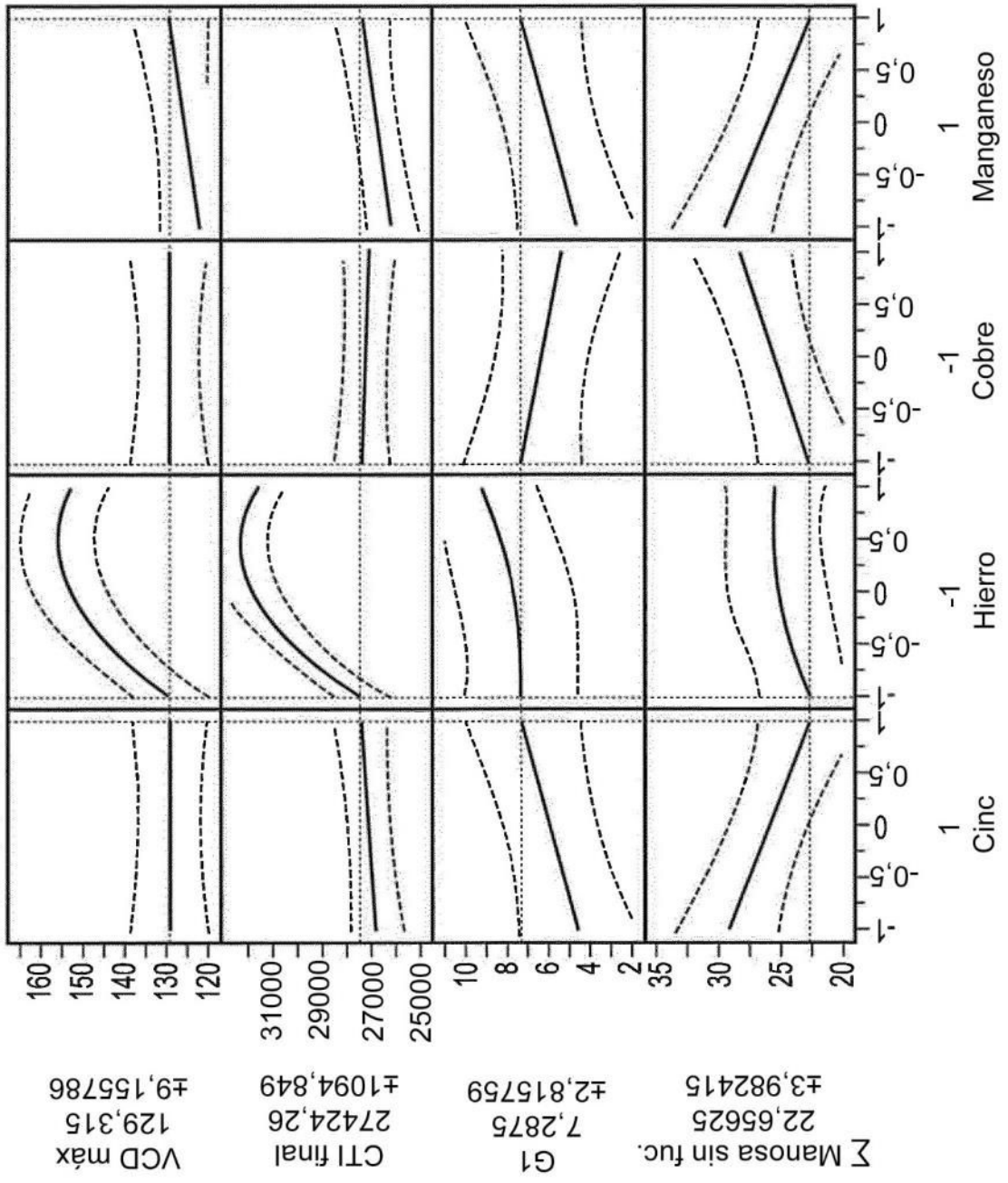


FIG. 8 (continuación)

G

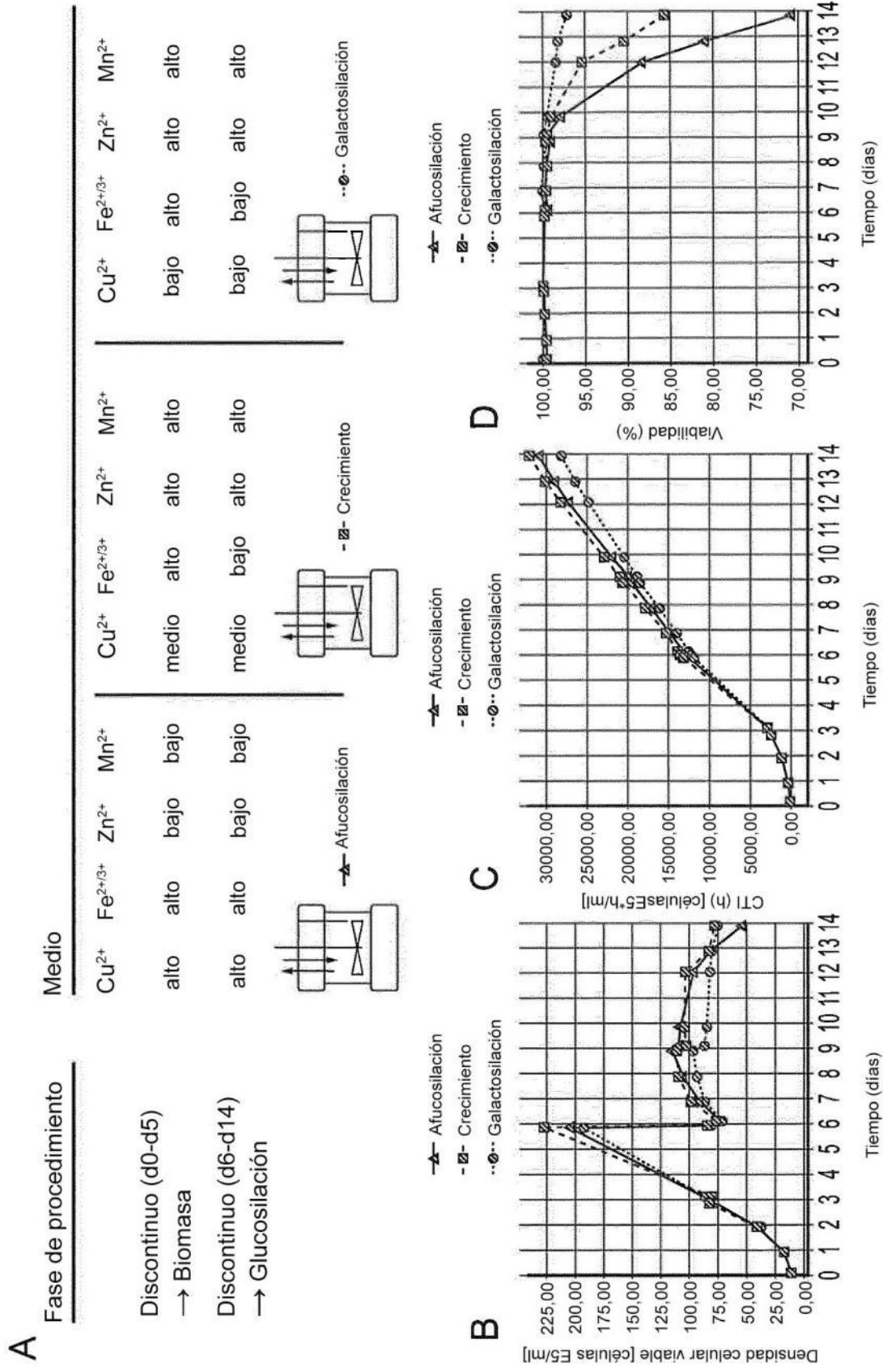


FIG. 9

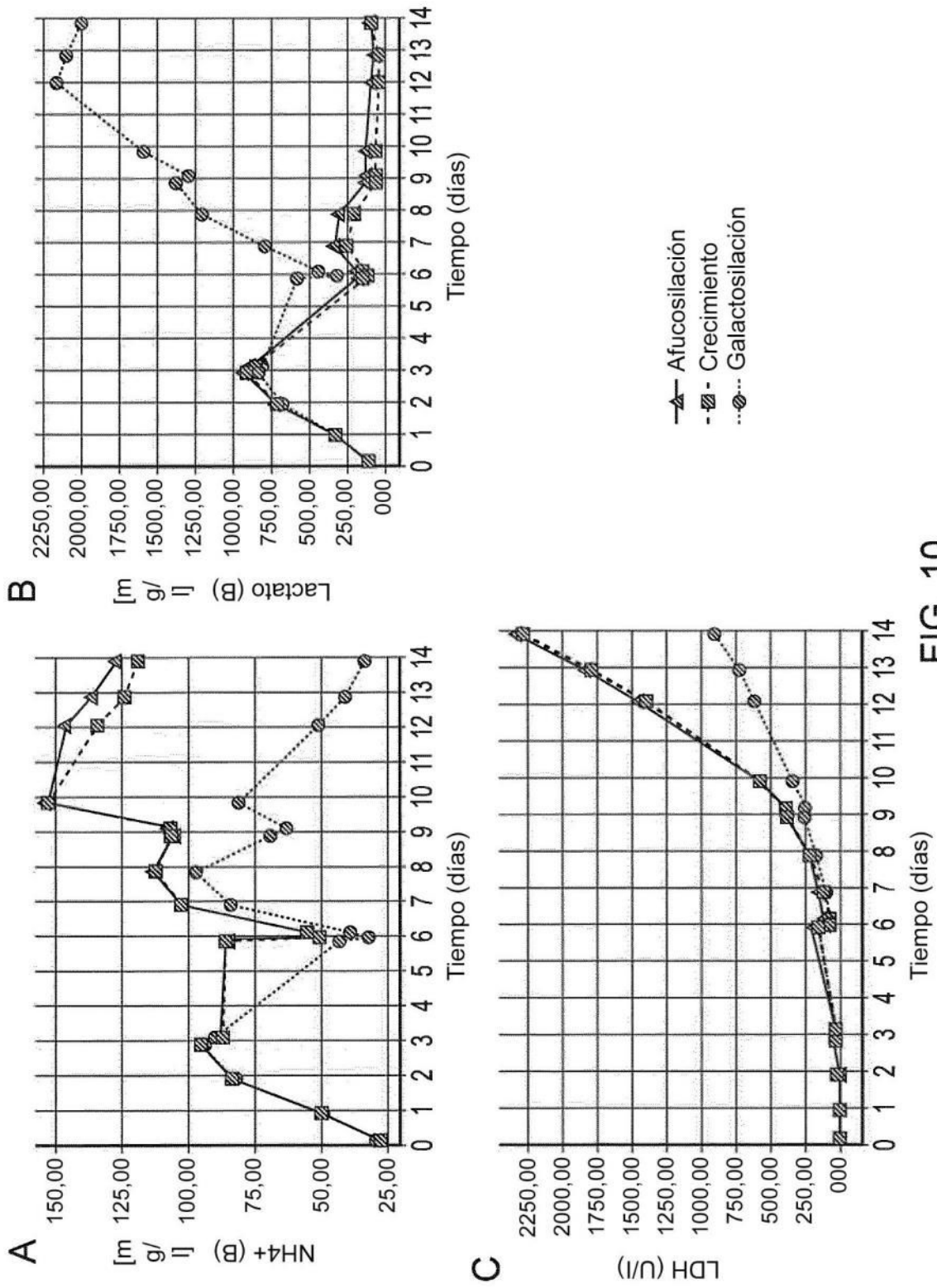
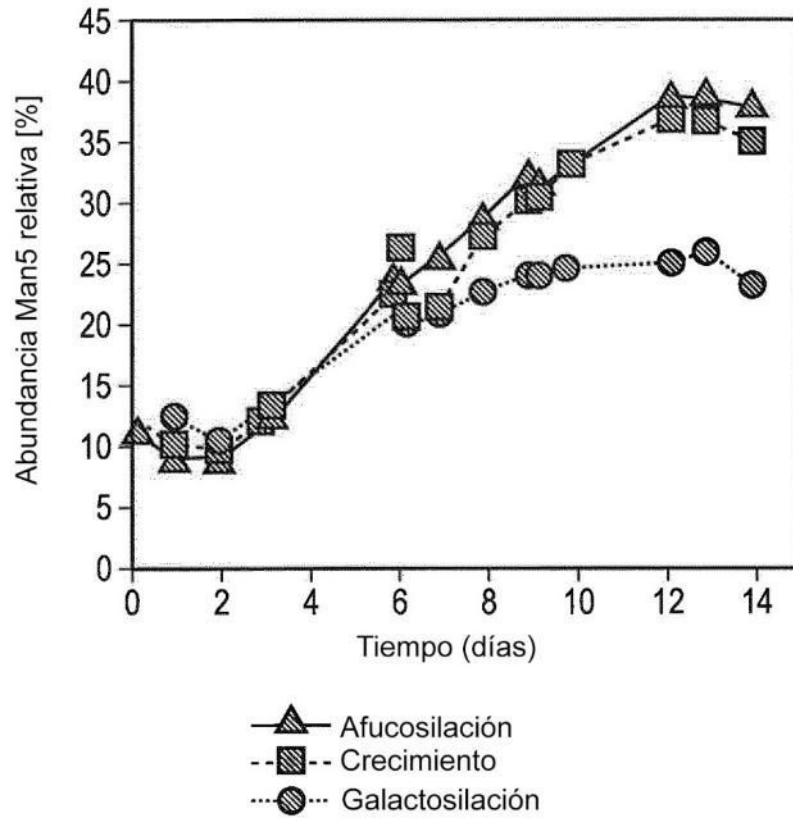


FIG. 10

A



B

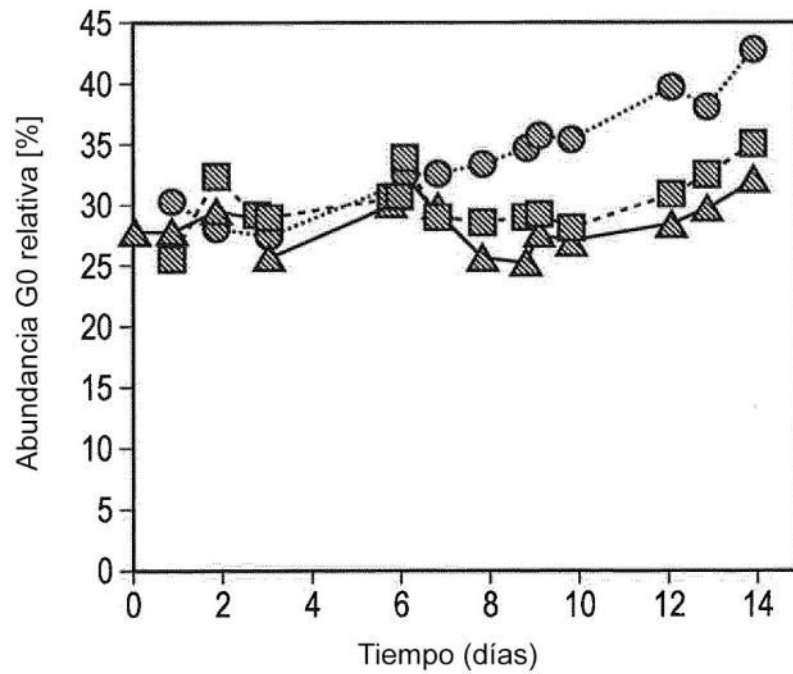
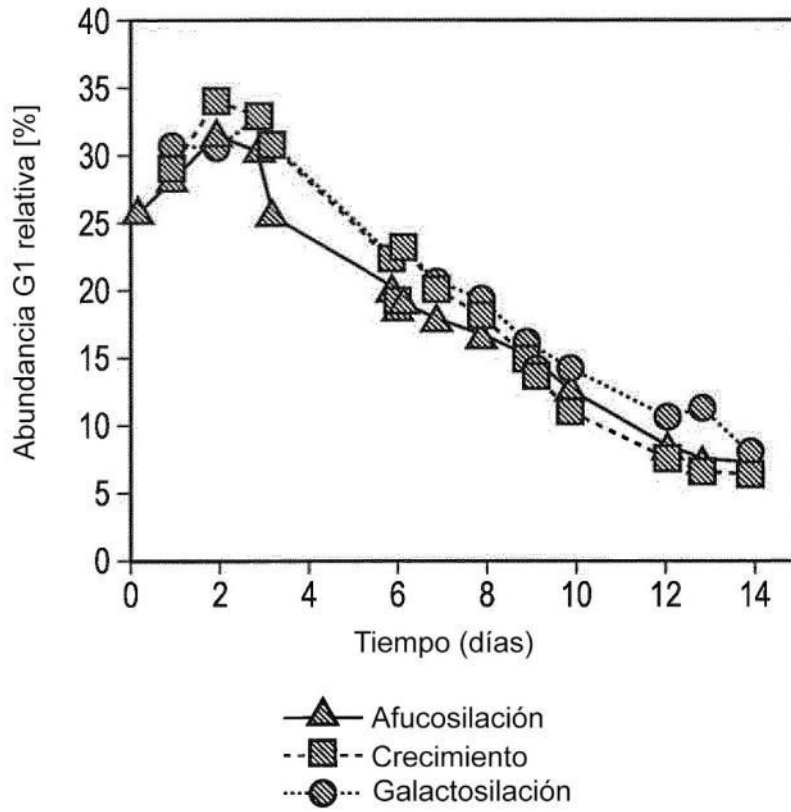


FIG. 11



C



D

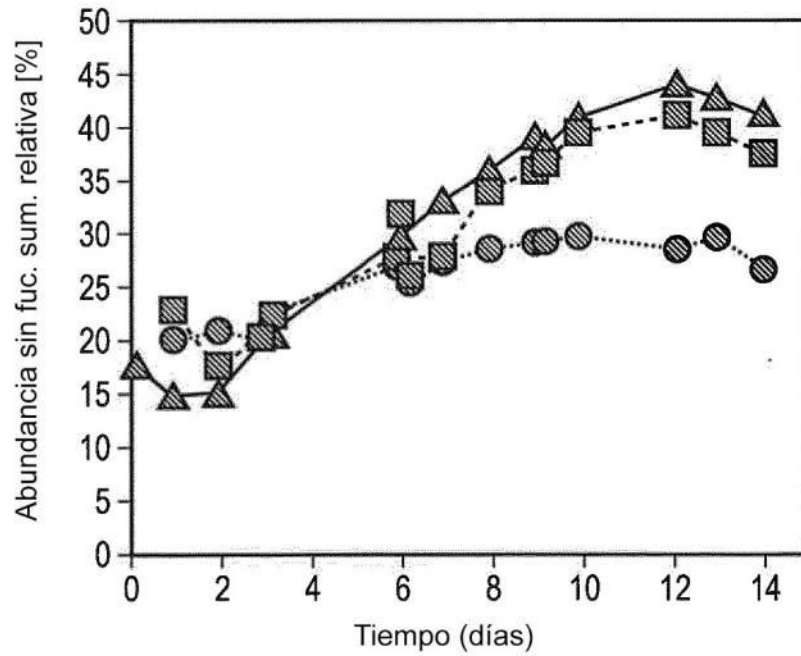


FIG. 11 (continuación)

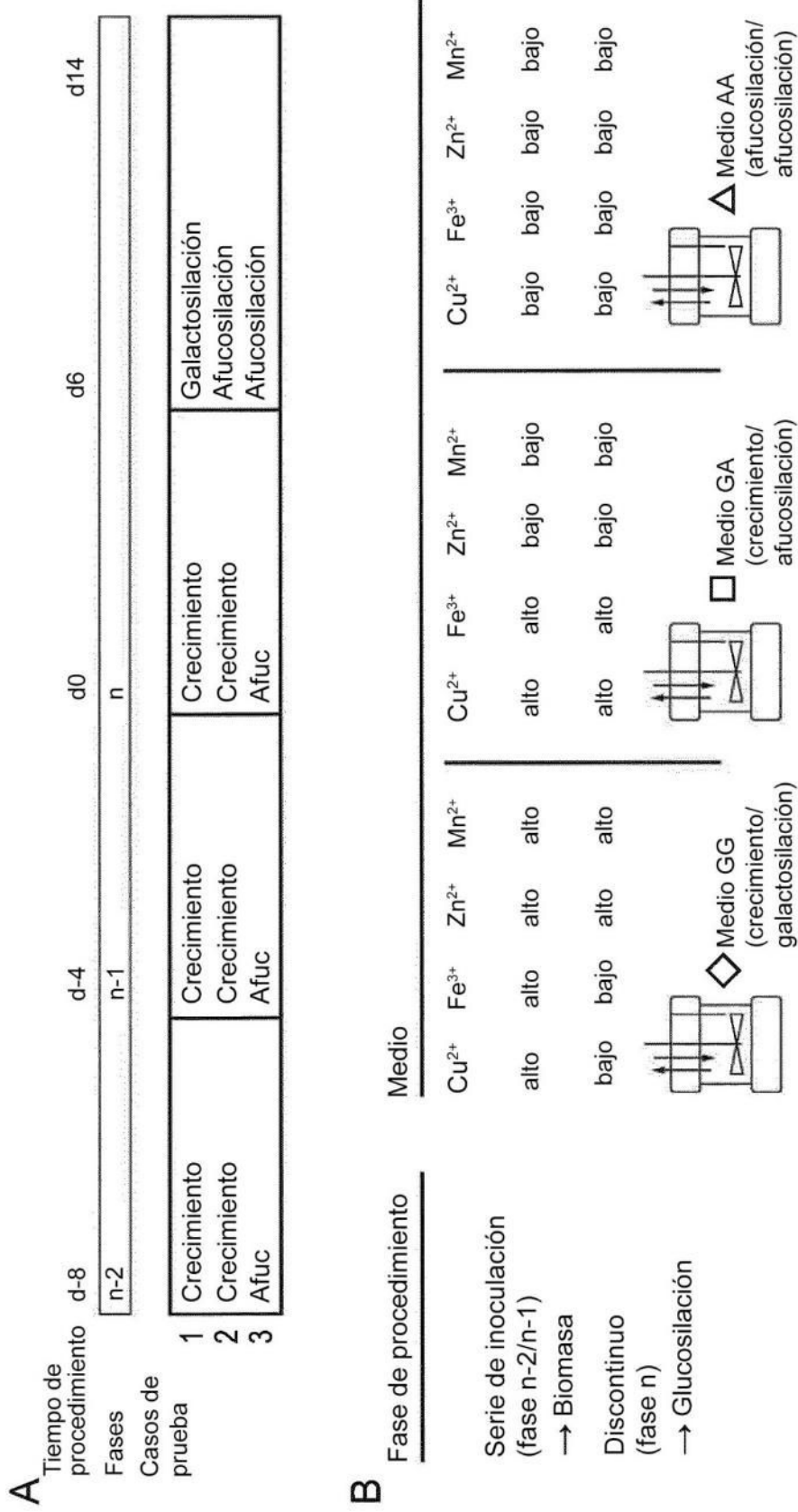


FIG. 12

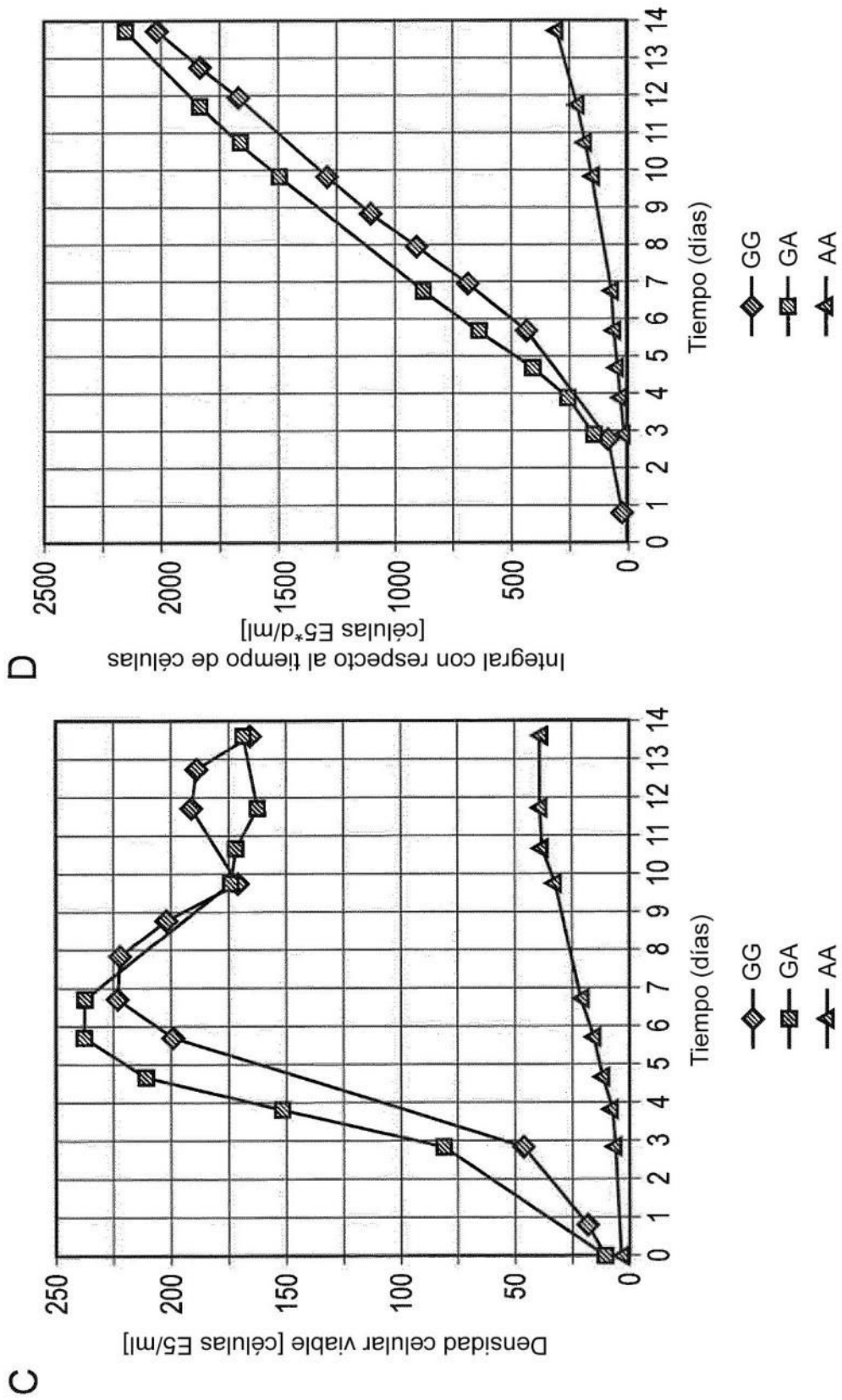


FIG. 12 (continuación)

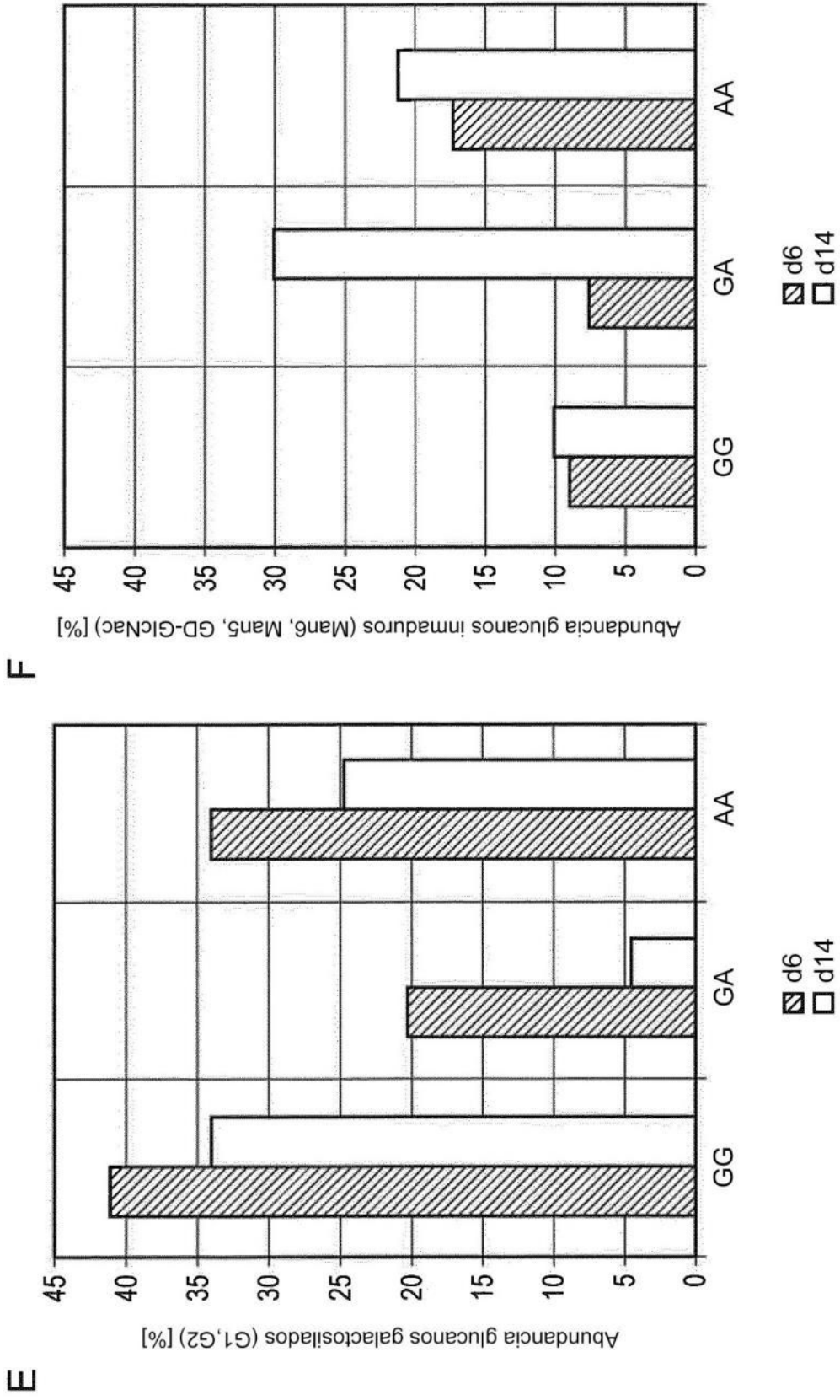
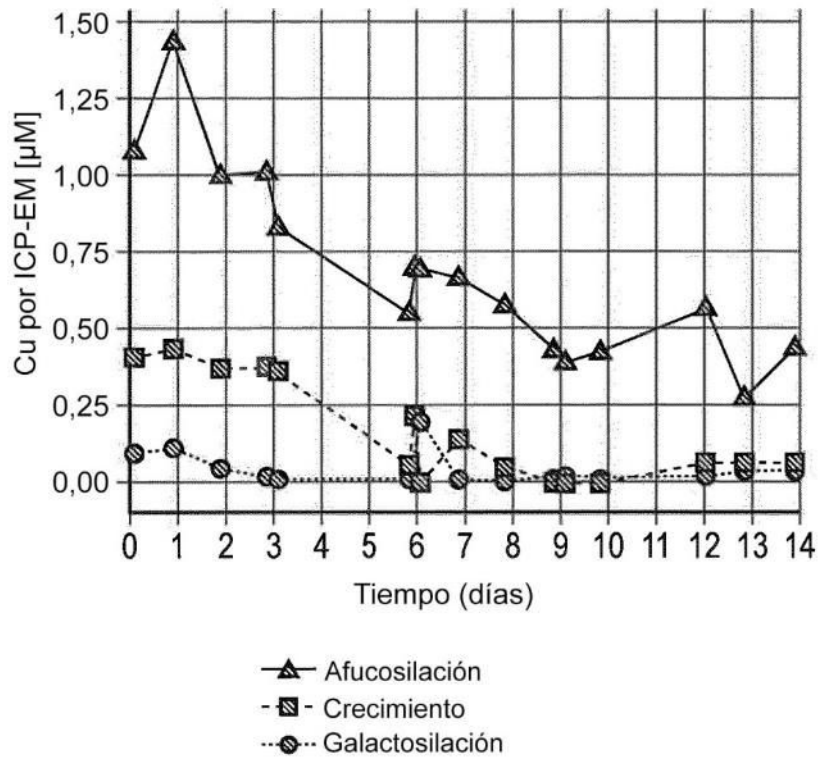


FIG. 12 (continuación)

A



B

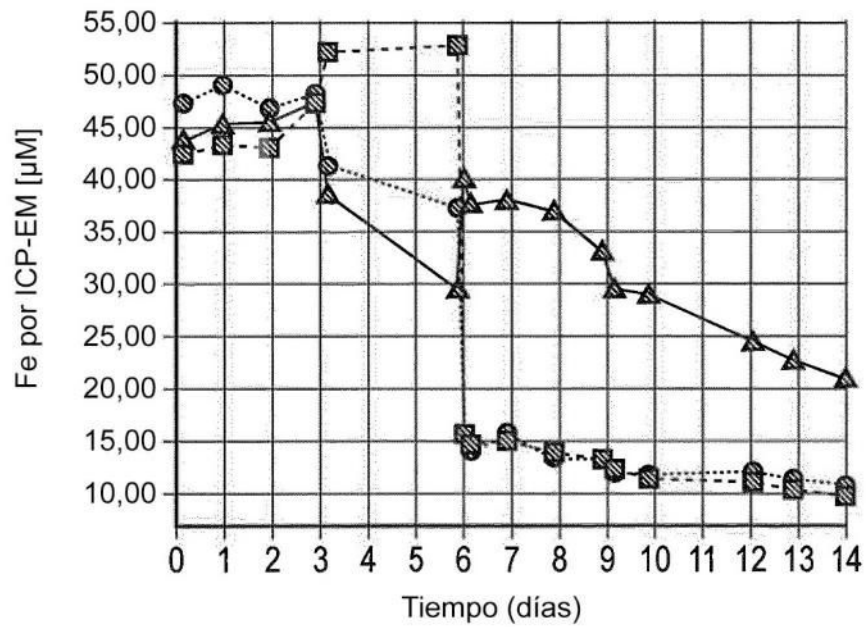
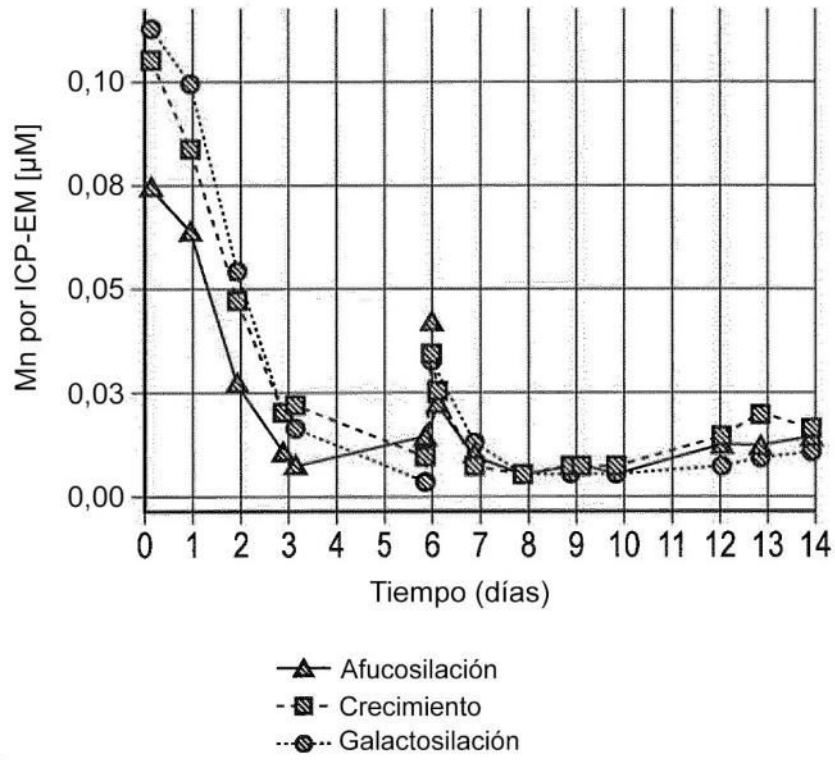


FIG. 13

C



D

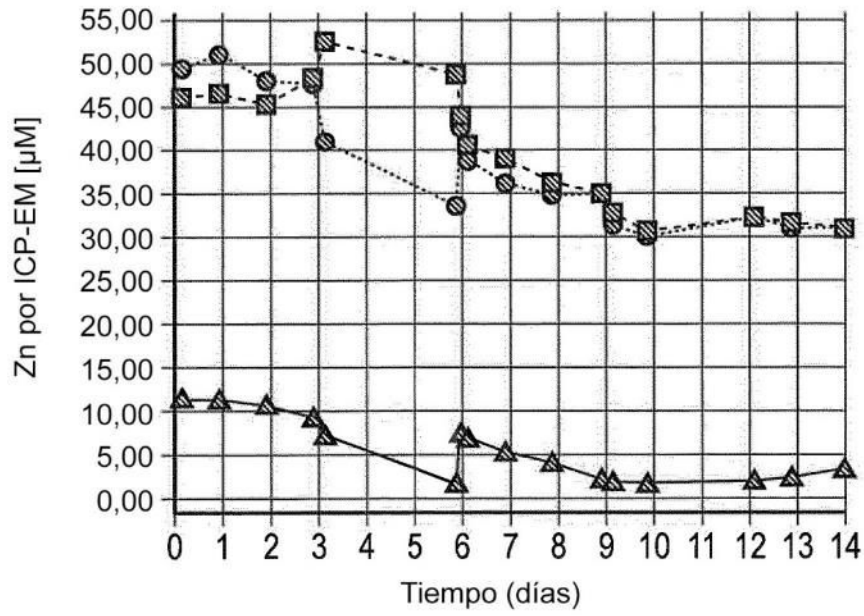
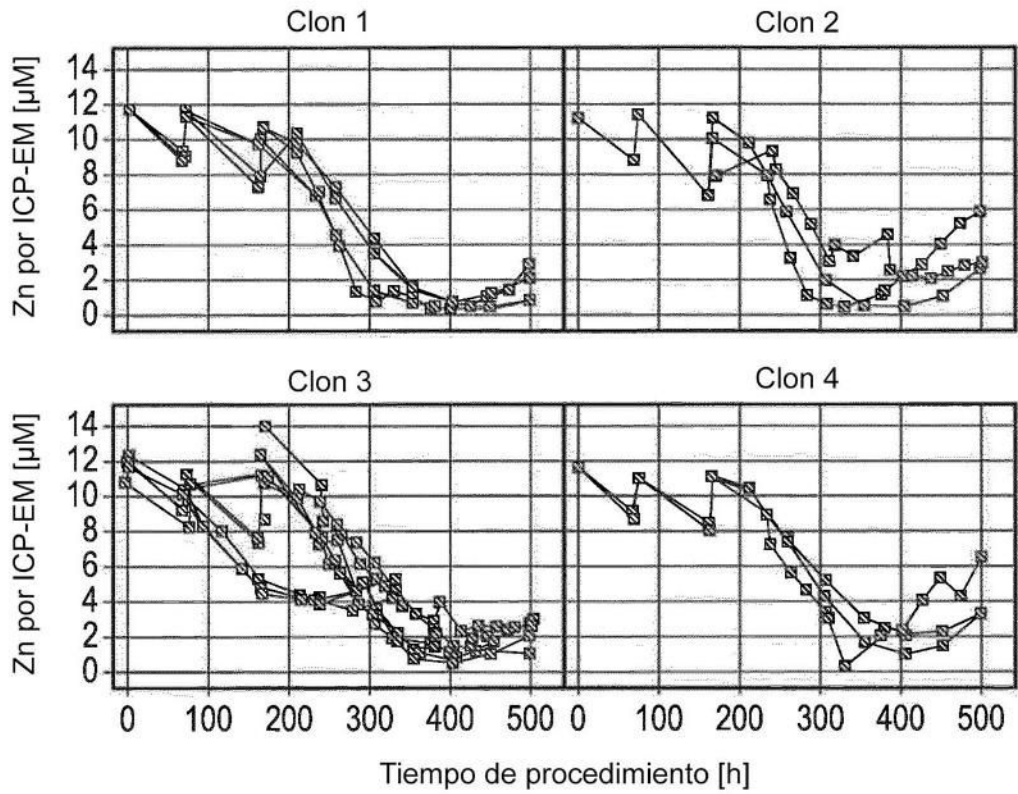
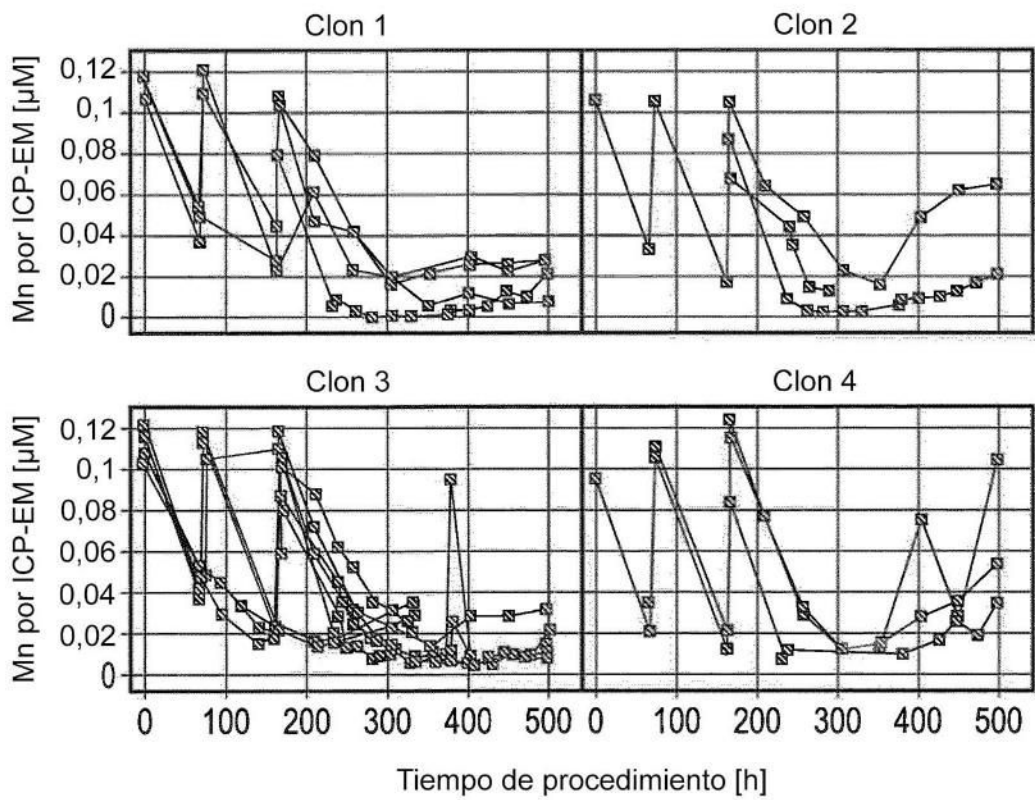


FIG. 13 (continuación)

**A**

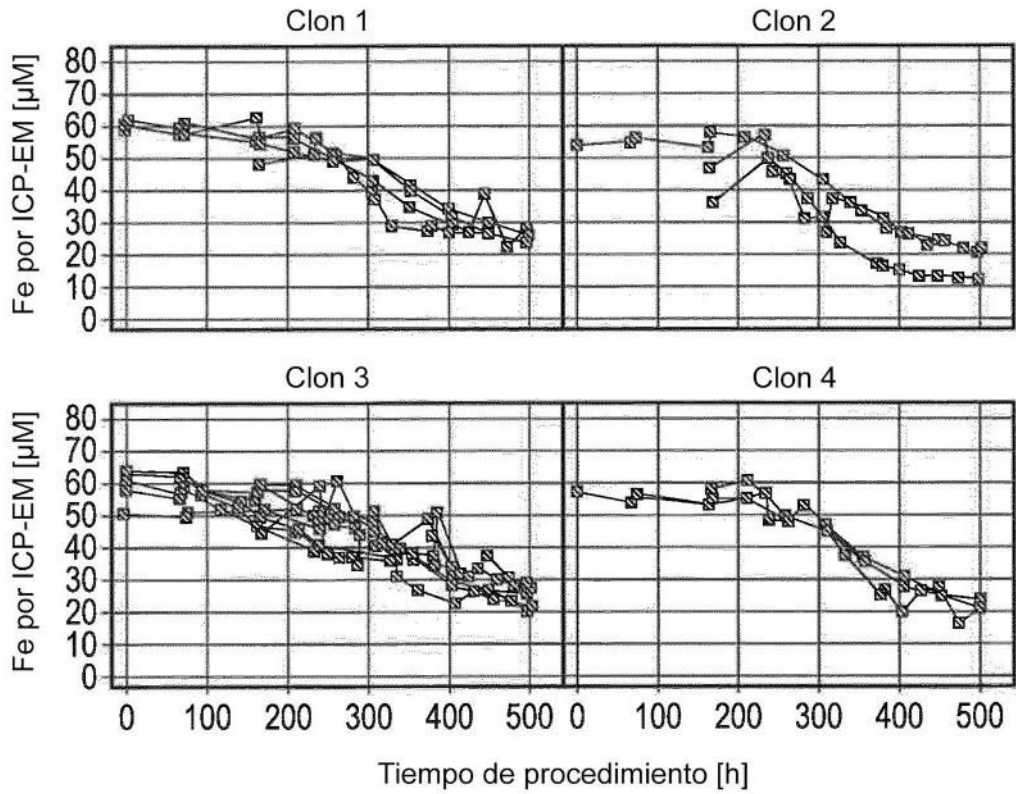


**B**



**FIG. 14**

C



D

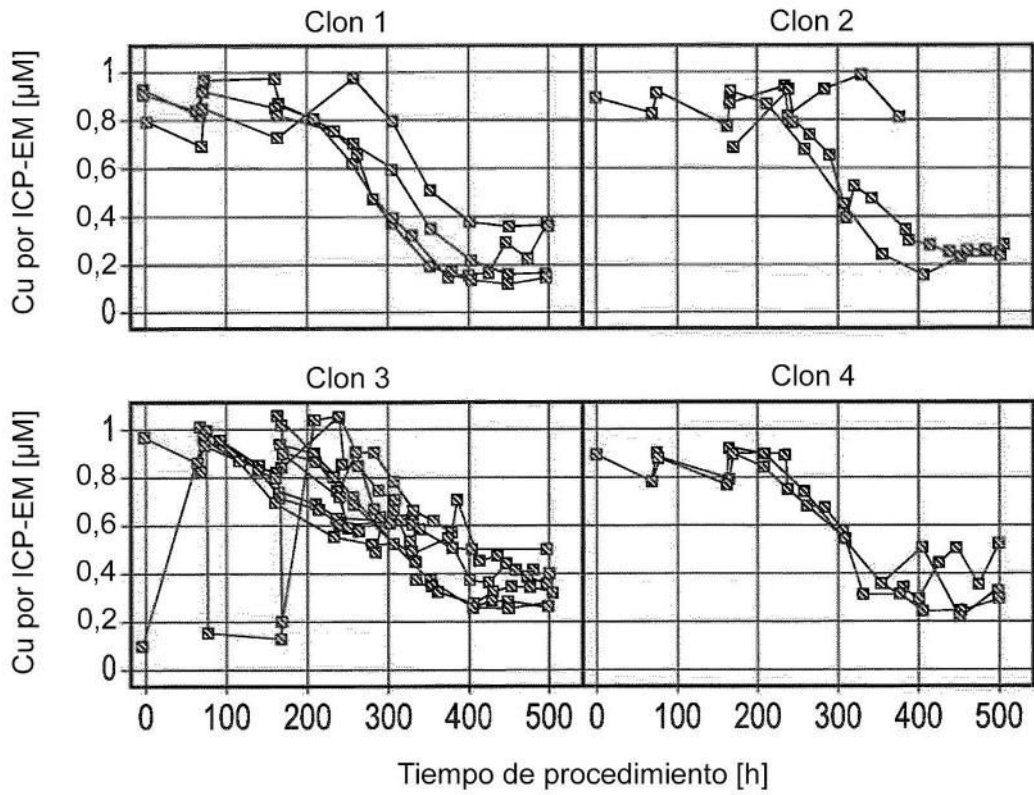


FIG. 14 (continuación)



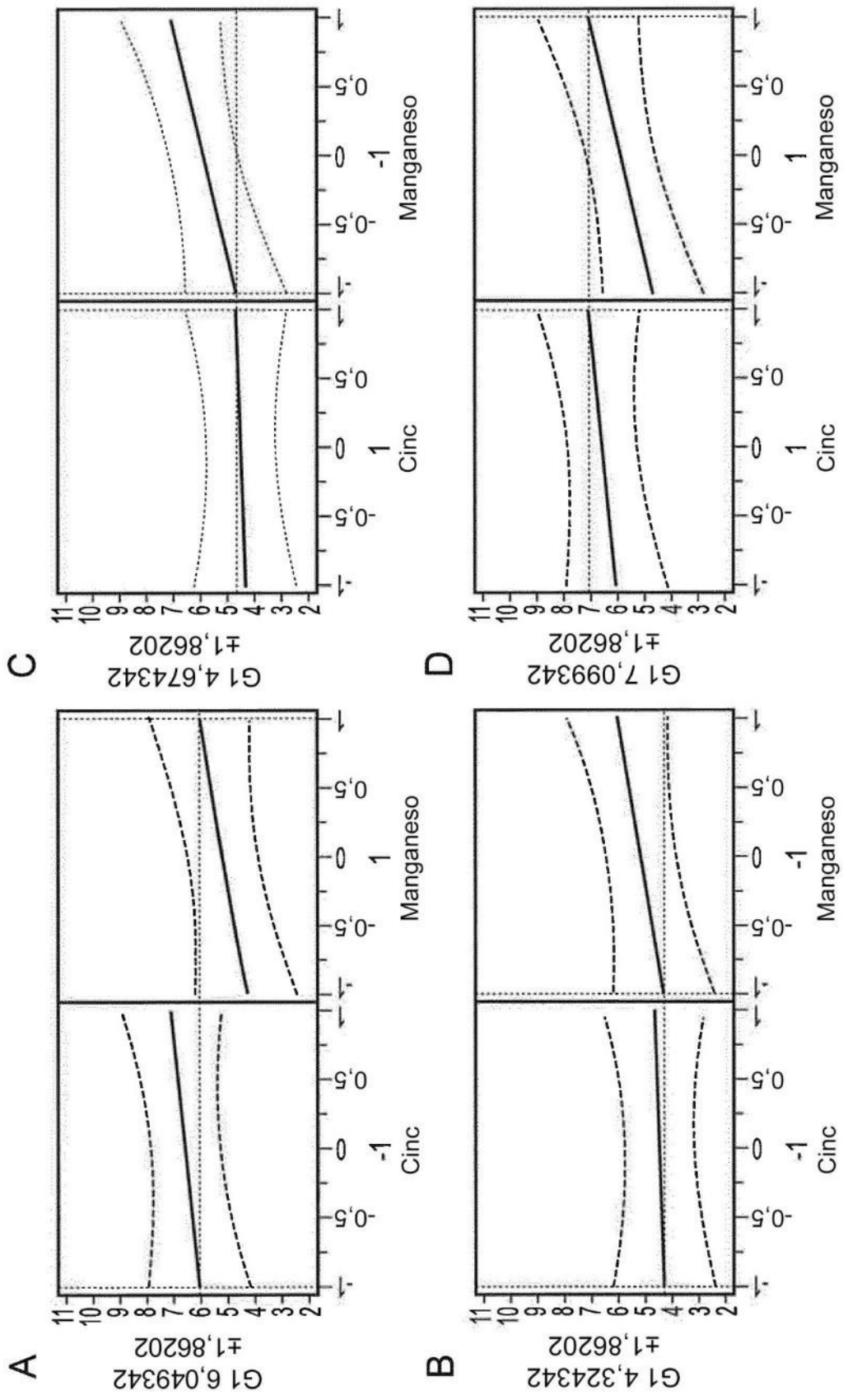


FIG. 15

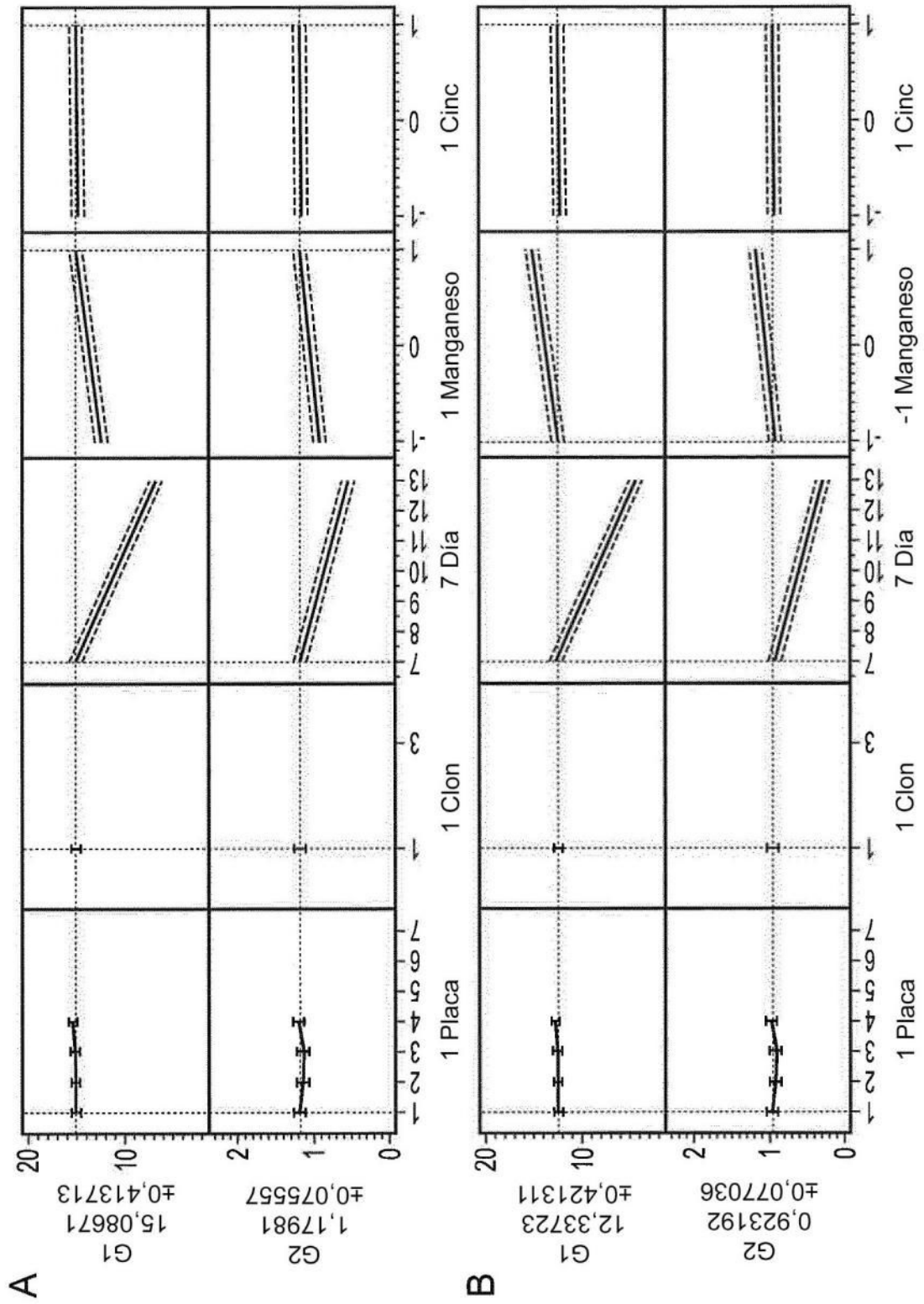


FIG. 16

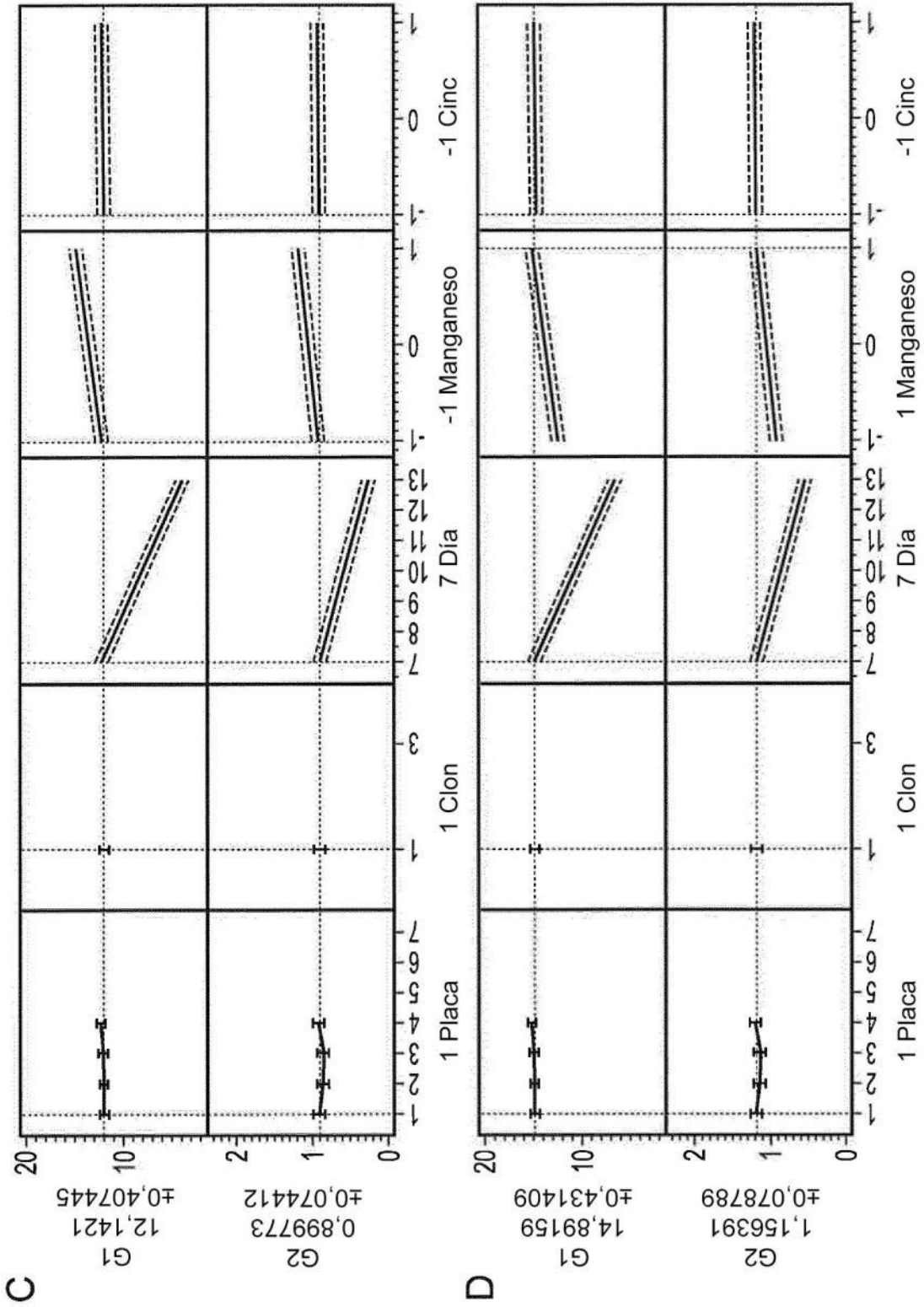


FIG. 16 (continuación)