

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 618**

51 Int. Cl.:
G06F 19/28 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08754908 .5**
96 Fecha de presentación: **15.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2137655**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Productos de glucoproteínas definidas y métodos relacionados**

30 Prioridad:
16.04.2007 US 912102 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
675 WEST KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:
**VENKATARAMAN, GANESH;
COLLINS, BRIAN, EDWARD;
BOSQUES, CARLOS, J.;
THIRUNEELAKANTAPILLAI, LAKSHMANAN;
BULIK, DOROTA, A.;
PARSONS, IAN CHRISTOPHER;
SHRIVER, ZACHARY y
CHILLAKURU, RAJEEV**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, Isabel

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).

ES 2 389 618 T3

DESCRIPCIÓN

Productos de glucoproteínas definidas y métodos relacionados

La presente descripción se refiere a productos de glucoproteínas y a métodos relacionados, por ejemplo métodos para obtener productos de glucoproteínas de referencia y a métodos para diseñar procedimientos para obtener productos de glucoproteínas que tienen propiedades físicas y funcionales definidas.

ANTECEDENTES

Muchos fármacos en uso hoy en día son "fármacos de pequeñas moléculas". Estos fármacos existen como estructuras químicas simples que se obtienen sintéticamente. El ingrediente activo existe generalmente como un producto homogéneo. Estos fármacos de pequeñas moléculas y sus preparaciones se pueden caracterizar químicamente y generalmente se fabrican fácilmente mediante síntesis química comparativamente simple.

Un producto de glucoproteína típico difiere sustancialmente en términos de complejidad de un fármaco de pequeña molécula típico. Las estructuras de azúcar unidas a la cadena principal de aminoácido de una glucoproteína pueden variar estructuralmente de muchas maneras, incluyendo secuencia, ramificación, contenido de azúcar, y heterogeneidad. De este modo, los productos de glucoproteínas pueden ser mezclas heterogéneas complejas de muchas moléculas estructuralmente diversas que tienen ellas mismas estructuras de glucano complejas. La glucosilación no sólo se añade a la complejidad estructural de la molécula, sino afecta a muchos de los atributos biológicos clínicos de la glucoproteínas.

Hasta la fecha, la creación de fármacos de glucoproteínas que tienen propiedades definidas, ya sea en un intento para producir una versión genérica de un fármaco existente o para producir una segunda generación u otra glucoproteína que tiene propiedades mejoradas o deseables, ha sido científicamente desafiante debido a la dificultad para comprender y sintetizar estas estructuras químicas complejas y las mezclas que las contienen.

La situación con respecto a la producción de productos genéricos es indicativa de los problemas encarados a la hora de obtener fármacos de glucoproteínas que tienen propiedades definidas. Aunque se han implementado procedimientos reguladores abreviados para versiones genéricas de productos farmacéuticos, muchos en la industria biotecnológica y farmacéutica han aceptado el punto de vista de que la complejidad de los productos biológicos los hacen inadecuados para enfoques similares.

Métodos para obtener glucoproteínas

Los métodos descritos aquí permiten la producción de glucoproteínas que tienen estructuras de glucano definidas y/o propiedades funcionales definidas mediadas por glucanos. Algunos métodos se basan en el uso de bases de datos que incluyen correlaciones entre parámetros de producción y propiedades deseadas de glucanos. La base de datos puede proporcionar parámetros de producción para la incorporación en un protocolo de producción. Los métodos permiten la producción de glucoproteínas diseñadas o glucoproteínas en general que tienen propiedades de glucanos definidas.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para obtener un producto de glucoproteína que tiene una propiedad de glucano diana, comprendiendo el método:

en un sistema de ordenador que tiene una base de datos, almacenar en el sistema de ordenador una pluralidad de propiedades de glucano y correlacionar, en la base de datos, cada una de la pluralidad de propiedades de glucano con uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción,

i) introducir en el sistema de ordenador una propiedad de glucano diana seleccionada de galactosilación, fucosilación, manosa elevada, estructuras híbridas, y sus combinaciones;

ii) seleccionar, mediante el sistema de ordenador a partir de la base de datos, una pluralidad de parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlaciona con la propiedad de glucano diana, en el que al menos una combinación seleccionada de parámetros de producción y la propiedad de glucano diana están correlacionados en dicha base de datos mediante una función correlativa no lineal o una función correlativa constreñida, y en el que dicha al menos una combinación seleccionada de parámetros de producción incluye un primer parámetro de producción y un segundo parámetro de producción, en el que dicho primer parámetro de producción es el contenido de glucosamina de un medio de cultivo celular, y dicho segundo parámetro de producción es el contenido de uridina de un medio de cultivo celular;

iii) extraer del sistema de ordenador los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción; y

iv) aplicar los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción en un procedimiento para obtener el producto de glucoproteína, etapa de aplicación la cual comprende incorporar los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción en un sistema de producción y mantener dicho sistema en condiciones que permitan la producción del producto de glucoproteína,

obteniendo de ese modo el producto de glucoproteína;

en el que:

5 la función correlativa no lineal representa una relación en la que el efecto de dicho primer parámetro de producción y dicho segundo parámetro de producción que actúan juntos sobre dicha propiedad de glucano diana no es la misma que la combinación de dicho primer parámetro de producción que actúa solo sobre dicha propiedad de glucano diana junto con el efecto de dicho segundo parámetro de producción que actúa solo sobre dicha propiedad de glucano diana; y

10 la función correlativa constreñida se refiere a un valor para dicho primer parámetro de producción a un valor para dicha propiedad de glucano diana seleccionada de galactosilación y manosa elevada, y también identifica uno o ambos de: una segunda propiedad de glucano que es alterada por dicho primer parámetro de producción; y que dicho segundo parámetro de producción se puede usar junto con el primer parámetro de producción para modular el efecto global de dicho primer parámetro de producción en una segunda propiedad de glucano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un medio legible por el ordenador que comprende un código que, cuando se ejecuta en un sistema de procesamiento de datos, lleva a cabo las etapas i), ii) y iii) del método anterior.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sistema de ordenador que comprende medios para llevar a cabo las etapas i), ii) y iii) del método anterior.

Más generalmente, la presente descripción se refiere a un método para obtener un producto de glucoproteína, que incluye las etapas de:

20 i) proporcionar una base de datos que correlaciona, define, identifica, se refiere, o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción;

ii) identificar una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primario;

25 iii) seleccionar de una base de datos uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlaciona con la propiedad de glucano diana; y

iv) aplicar el parámetro de producción seleccionado o las combinaciones de parámetros de producción en un procedimiento para obtener el producto de glucoproteína,

obteniendo de ese modo un producto de glucoproteína.

30 Como se discute con detalle en otra parte aquí, los métodos, bases de datos y sistemas descritos aquí pueden incluir o usar diversos tipos de correlaciones entre los parámetros de producción y las propiedades de los glucanos que condicionan. Estas se denominan como funciones correlativas. La producción de glucoproteínas es un proceso complejo, y las correlaciones proporcionadas en las bases de datos pueden reflejar esto mismo. Las funciones correlativas ejemplares incluyen funciones correlativas no lineales. Una correlación no lineal puede reflejar una
35 relación entre parámetros de producción y propiedades de glucano, en la que el efecto de dos (o más) parámetros de producción que actúan juntos sobre una propiedad de glucano no es el mismo que la combinación de un primer parámetro de producción (que actúa solo) sobre la propiedad de glucano junto con el efecto de un segundo parámetro de producción (que actúa solo) sobre la propiedad de glucano. Esto se puede expresar como:

40 $X1 \rightarrow Y1; X2 \rightarrow Y2; X1 + X2 \neq Y1 + Y2$, por ejemplo $X1 + X2 \rightarrow Y3$, en la notación usada aquí. Otros tipos de funciones correlativas útiles en los métodos, bases de datos y sistemas descritos aquí incluyen funciones correlativas constreñidas, pleyotrópicas y ajustables. De forma breve, las funciones correlativas constreñidas reflejan la complejidad de la síntesis de glucoproteínas, y pueden representar relaciones caracterizadas mediante combinaciones o parámetros de producción o propiedades de glucano incompatibles o indeseables. Por ejemplo, una combinación de parámetros de producción puede estar constreñida debido a que da como resultado una propiedad de glucano indeseable. Las funciones correlativas pleyotrópicas pueden reflejar el efecto variado de uno o
45 más parámetros de producción sobre características de glucano diferentes. Una función ajustable es aquella que puede permitir una pluralidad de entradas, por ejemplo entradas de diferentes magnitudes, y una pluralidad de salidas, por ejemplo de magnitud diferente. Puede permitir el ajuste de una propiedad de glucano mediante el ajuste de un parámetro de producción. Estas y otras funciones correlativas se explican con más detalle más abajo.

50 En consecuencia, en un ejemplo de la descripción, la base de datos incluye diez o más, por ejemplo 20, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más, correlaciones ajustables, no lineales, pleyotrópicas, o constreñidas. En un caso, un parámetro de producción seleccionado se asocia con una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica o constreñida.

En un caso, un primer parámetro de producción X1 se selecciona mediante una función correlativa entre el parámetro de producción X1 y una propiedad de glucano Y1 y una propiedad de glucano Y2, y se selecciona un segundo parámetro de producción X2 para modificar el efecto de X1 sobre Y2.

En otro caso, la descripción describe un método para obtener un producto de glucoproteína. El método comprende:

- 5 a) opcionalmente, proporcionar un parámetro de producción seleccionado
- b) proporcionar un sistema de producción, por ejemplo un sistema de cultivo celular, que incorpora un parámetro de producción seleccionado; y
- c) mantener dicho sistema en condiciones que permiten la producción del producto de glucoproteína, obteniendo de ese modo el producto de glucoproteína, en el que el parámetro de producción seleccionado se identifica mediante un método descrito aquí, por ejemplo:
- 10 i) proporcionando una base de datos que correlacione, defina, identifique, relaciones o proporcione cada una de una pluralidad de proteínas de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción;
- 15 ii) identificar una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primaria; y
- iii) seleccionar de la base de datos uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlacionan con la propiedad de glucano diana.

En un caso, el parámetro de producción seleccionado fue o se identificó:

seleccionando una glucoproteína primaria,

- 20 proporcionando un patrón de glucano que representa estructuras de glucano en una glucoproteína de referencia, por ejemplo una glucoproteína primaria, por ejemplo liberando glucanos de la glucoproteína de referencia, por ejemplo mediante digestión enzimática, y opcionalmente separando los glucanos liberados, por ejemplo, para producir fracciones o picos que representan una o más proteínas de glucano,
- seleccionando una propiedad de glucano,
- 25 seleccionando de la base de datos uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlacionan con la propiedad de glucano diana.

En un caso, la provisión de un parámetro de producción seleccionado incluye recibir la identidad del parámetro de otra entidad. En un caso, una primera entidad lleva a cabo uno o más de a), b) y c), y una segunda entidad lleva a cabo una o más de las etapas i), ii), y iii) y transmite la identidad del parámetro seleccionado a la primera entidad. De este modo, al igual que en otros métodos descritos aquí, una única entidad puede llevar a cabo todas las etapas o puede recibir o puede estar provista de información o selecciones necesarias para la práctica mediante una segunda entidad o más.

- 30 En un caso, la base de datos incluye diez o más, por ejemplo 20, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más, correlaciones ajustables, no lineales, pleyotrópicas, o constreñidas. En un caso, un parámetro de producción seleccionado está asociado con una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para producir un producto de glucoproteína que tiene una o una pluralidad de propiedades de glucano diana, que incluye:

- a) identificar una propiedad o propiedades de glucano diana, por ejemplo una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primaria; y
- 40 b) producir dicho producto de glucoproteína que tiene una o una pluralidad de propiedades de glucano diana mediante un método de producción, en el que dicho método de producción se seleccionó o se selecciona según lo siguiente:
- i) caracterizar opcionalmente un producto de glucoproteína primaria para identificar una o una pluralidad de propiedades de glucano, por ejemplo características de glucano, del producto de glucoproteína primaria;
- 45 ii) opcionalmente, proporcionar una base de datos que correlaciona, define, identifica, relaciona, o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción; y
- iii) seleccionar para uso en el método de producción 1, 2, 3, o más parámetros de producción, o combinaciones de parámetros de producción, correlacionados positivamente con la incidencia de dicha propiedad o propiedades de

glucano diana, por ejemplo seleccionando uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción basándose en las correlaciones proporcionadas por dicha base de datos.

5 En un caso, la base de datos incluye diez o más, por ejemplo 20, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más de una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida. En un caso, un parámetro de producción seleccionado está asociado con una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida.

En un caso, el método incluye además una o más de las siguientes etapas:

10 iv) expresar una secuencia de aminoácidos, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de dicho producto de glucoproteína primaria, en un procedimiento usando dicho parámetro o parámetros seleccionados, y determinar si la propiedad de glucano diana, por ejemplo una característica de glucano correlacionada con dicho parámetro o parámetros seleccionados es conferida en dicha secuencia de aminoácidos;

v) seleccionar un parámetro de producción adicional a partir de dicha base de datos;

15 vi) expresar una secuencia de aminoácidos, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de dicho producto de glucoproteína primaria, en un procedimiento usando dicho parámetro seleccionado adicional, y determinar si la propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano correlacionada con dicho parámetro seleccionado adicional, está incluida en dicha secuencia de aminoácidos; y

vii) opcionalmente, repetir las etapas v y vi 1, 2, 3 o más veces.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para obtener un producto de glucoproteína que incluye obtener la glucoproteína mediante un procedimiento seleccionado:

20 i) identificando una o una pluralidad de propiedades de glucano requeridas, por ejemplo características de glucano, de dicho producto de glucoproteína;

ii) identificando uno o más parámetros de producción que proporcionará dicha una o una pluralidad de propiedades de glucano requeridas; y

25 iii) seleccionando secuencialmente al menos 2, 3, 4 ó 5 parámetros de producción para proporcionar la propiedad o característica de glucano requerida, en el que dichos parámetros de producción se pueden seleccionar del grupo que consiste en: identidad celular, condiciones del cultivo celular, condiciones de fermentación, condiciones de aislamiento, y condiciones de formulación, y sus combinaciones.

30 En algunos casos, los métodos descritos aquí se pueden implementar por ordenador. En otros casos, los métodos no se implementan por ordenador, por ejemplo una base de datos sobre la que se basan no está implementada por ordenador. Los casos pueden incluir presentar, proporcionar o memorizar un parámetro de producción o característica de glucano seleccionado.

Métodos de diseño de protocolos de producción

35 Los métodos descritos aquí permiten diseñar protocolos o seleccionar condiciones para obtener glucoproteínas. Los métodos permiten la elección de parámetros de producción, que, cuando se incorporan en un protocolo para obtener una glucoproteína, proporcionan la incorporación en la glucoproteína de estructuras de glucano preseleccionadas y/o propiedades funcionales mediadas por glucano.

En otro caso, la descripción se refiere a un método, por ejemplo un método implementado por ordenador, que incluye:

seleccionar un parámetro de producción;

40 identificar una propiedad de glucoproteína, por ejemplo una característica de glucoproteína, que está asociada con dicho parámetro de producción; y

opcionalmente presentar, proporcionar o memorizar dicha propiedad de glucoproteína identificada.

En otro caso, la descripción se refiere a un método, por ejemplo un método implementado por ordenador, que incluye:

seleccionar una propiedad de glucoproteína, por ejemplo una característica de glucoproteína;

45 identificar un parámetro de producción que está asociado con dicha propiedad de glucoproteína; y

opcionalmente presentar, proporcionar o memorizar dicho parámetro de producción identificado.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para diseñar un procedimiento para producir un producto de glucoproteína, o seleccionar un elemento de un procedimiento para obtener un producto de glucoproteína, incluyendo el método las etapas de:

- 5 a) proporcionar una base de datos que correlaciona, define, identifica, relaciona, o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción;
- b) identificar una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primaria;
- 10 c) seleccionar de la base de datos uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlacionan con la propiedad de glucano diana; y
- diseñar de ese modo un procedimiento para producir un producto de glucoproteína.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para diseñar un procedimiento para obtener, o seleccionar un elemento de un procedimiento para obtener, un producto de glucoproteína, incluyendo el método:

- 15 a) identificar una propiedad o propiedades de glucano diana, por ejemplo una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primaria; y
- b) caracterizar opcionalmente el producto de glucoproteína diana para identificar una o una pluralidad de proteínas de glucano, por ejemplo características de glucano, de dicho producto de glucoproteína primaria;
- 20 c) proporcionar una base de datos que correlaciona, define, identifica, relaciona, o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción; y
- d) seleccionar para uso en el método de producción 1, 2, 3, o más parámetros de producción, o combinaciones de parámetros de producción, correlacionados positivamente con la incidencia de dicha propiedad o propiedades de glucano diana, por ejemplo seleccionar uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción basándose en las correlaciones proporcionadas por dicha base de datos,
- 25 diseñar de ese modo un procedimiento para obtener, o seleccionar un elemento de un procedimiento para obtener, un producto de glucoproteína.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para diseñar un procedimiento para obtener, o seleccionar un elemento de un procedimiento para obtener, un producto de glucoproteína, incluyendo el método:

- 30 i) identificar una o una pluralidad de características de glucano, requeridas de dicho producto de glucoproteína;
- ii) identificar uno o más parámetros de producción que proporcionarán dicha una o una pluralidad de características de glucano requeridas; y
- 35 iii) seleccionar secuencialmente al menos 2, 3, 4 ó 5 parámetros de producción para proporcionar las características de glucano requeridas, en el que dichos parámetros de producción se pueden seleccionar del grupo que consiste en: identidad celular, condiciones de cultivo celular, condiciones de fermentación, condiciones de aislamiento, y condiciones de formulación, y sus combinaciones.

En un caso de métodos descritos aquí, la base de datos puede incluir una o más de una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida. En un caso, un parámetro de producción seleccionado está asociado con una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida.

- 40 En algunos casos, los métodos descritos aquí se pueden implementar por ordenador. En otros casos, los métodos no están implementados por ordenador, por ejemplo una base de datos en la que se basan no está implementada por ordenador. Los casos pueden incluir presentar, proporcionar o memorizar un parámetro de producción o característica de glucano seleccionado.

Control y monitorización de producción de glucoproteína

- 45 Los métodos, bases de datos y sistemas descritos aquí se pueden usar en una variedad de aplicaciones, incluyendo métodos de control de calidad o monitorización de la producción. Por ejemplo, los métodos descritos aquí se pueden usar para monitorizar una glucoproteína obtenida mediante un procedimiento definido. Por ejemplo, si la glucoproteína se analiza y no se encuentra que tiene una propiedad de glucano requerida, los métodos descritos aquí se pueden usar para seleccionar alteraciones en el procedimiento de producción para ajustar o alterar el procedimiento de forma que produzca una glucoproteína que tenga la propiedad de glucano requerida.

En consecuencia, la descripción se refiere a un método para monitorizar y/o controlar la producción de una glucoproteína. El método incluye:

a) proporcionar una característica de glucano observada a partir de una glucoproteína obtenida mediante un procedimiento de producción predeterminado;

5 b) proporcionar una comparación de la característica de glucano observada con un valor de referencia;

c) si el valor observado difiere en más de un nivel umbral del valor de referencia, seleccionar un valor para un parámetro de producción mediante un método descrito aquí, por ejemplo mediante uso de una base de datos descrita aquí; y

10 d) alterar opcionalmente el valor del parámetro de producción X en dicho procedimiento de producción predeterminado para proporcionar un procedimiento de producción alterado,

monitorizando y/o controlando de ese modo la producción de una glucoproteína.

En un caso, el método incluye además la etapa de proporcionar una característica de glucano observada a partir de una glucoproteína obtenida mediante el procedimiento de producción alterado, y evaluarla como se describe aquí. En casos, las etapas b), c) y d) se repiten para una glucoproteína obtenida mediante el procedimiento de producción alterado.

15

En un caso, el método se repite, por ejemplo, a intervalos predeterminados.

En un caso, la selección de un valor para un parámetro de producción incluye:

i) proporcionar una base de datos que correlaciona, define, identifica, relaciona o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción;

20

ii) identificar opcionalmente una propiedad de glucano diana; y

iii) seleccionar de la base de datos uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que desplaza la propiedad de glucano observada en la dirección de la propiedad de glucano de referencia.

25

En un caso, la propiedad de glucano observada se determinó o se determina: proporcionando un estándar de glucano que representa estructuras de glucano en la glucoproteína obtenida mediante el procedimiento de producción preseleccionado, por ejemplo liberando glucanos de la glucoproteína, por ejemplo mediante digestión enzimática, y opcionalmente separando los glucanos liberados, por ejemplo, para producir fracciones o picos que representan una o más propiedades de glucano.

30

En un caso, la característica de glucano de referencia se determinó o se determina: proporcionando un estándar de glucano que representa estructuras de glucano en la glucoproteína obtenida mediante el procedimiento de producción preseleccionado, por ejemplo mediante un experimento diferente, previo, del procedimiento preseleccionado, o mediante un procedimiento de producción diferente, por ejemplo un procedimiento de producción alterado, por ejemplo liberando glucanos de la glucoproteína, por ejemplo mediante digestión enzimática, y opcionalmente separando los glucanos liberados, por ejemplo, para producir fracciones o picos que representan una o más características de glucano.

35

En un caso, la base de datos incluye una o más, de una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida. En un caso, un parámetro de producción seleccionado está asociado con una correlación ajustable, no lineal, pleyotrópica, o constreñida.

40

Base de datos

Esta sección describe aspectos y elementos de bases de datos de la descripción. Estas se pueden combinar opcionalmente con métodos y sistemas descritos aquí.

En consecuencia, en otro caso, la descripción se refiere a una base de datos descrita aquí, por ejemplo una base de datos útil en un método de sistema descrito aquí.

45

En un caso, la base de datos está: dispuesta en medio tangible; dispuesta en una única unidad de medio tangible, por ejemplo en un único ordenador, o en un único documento en papel; se proporciona en más de una unidad de medio tangible, por ejemplo en más de un ordenador, en más de un único documento en papel, parcialmente en un documento en papel y parcialmente en un medio legible por ordenador; dispuesta en medio legible por ordenador; dispuesta en medio tradicional, por ejemplo papel, que es legible por un ser humano sin el uso de un ordenador, por ejemplo un documento, gráfico, tabla o catálogo de tarjeta impresos.

50

En un caso, cada documento de la base de datos no se almacena en el mismo sitio, ordenador, memoria o localización; la base de datos está configurada para permitir el acceso computerizado.

En un caso, la base de datos incluye una pluralidad de registros, en la que un registro incluye

un identificador de un parámetro de producción o una combinación de parámetros de producción,

5 un identificador para una propiedad de glucano, por ejemplo una propiedad funcional condicionada por un glucano, o una característica de glucano (es decir, una característica estructural), y

una función correlativa entre el parámetro de producción (o combinación) y la propiedad de glucano, que por ejemplo correlaciona, define, identifica, relaciona o proporciona uno con el otro.

10 En un caso, la correlación: es una correlación positiva o negativa; se estableció o se puede establecer mediante ensayo empírico o mediante predicción; es cualitativa, por ejemplo positiva, negativa, o sin correlación; es cuantitativa, por ejemplo una correlación positiva se puede expresar como una serie de correlaciones de puntuaciones cada vez mayores; se expresa en términos absolutos o con relación a un estándar, por ejemplo más o menos, cuánto, más o menos similar para conferir una característica de glucano particular en una proteína, como otro método.

15 **Sistemas**

Esta sección describe casos y elementos de sistemas útiles para implementar métodos y bases de datos descritos aquí.

En consecuencia, en otro caso, la descripción se refiere a un sistema que incluye:

20 un selector para seleccionar un parámetro de producción basado en una propiedad de glucoproteína de entrada, o para seleccionar una propiedad de glucoproteína basado en un parámetro de producción de entrada.

En un caso, el sistema incluye:

una base de datos descrita aquí, por ejemplo una base de datos que correlaciona, define, identifica, relaciona, o proporciona cada una de una pluralidad de propiedades de glucano como una función correlativa de uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción;

25 un interfaz de usuario para introducir una búsqueda;

un procesador para generar un resultado de búsqueda.

30 En un caso, el sistema está configurado para permitir el diseño de un procedimiento para producir un producto de glucoproteína diana que tiene una propiedad de glucano preseleccionada, por ejemplo para seleccionar un parámetro de producción para el uso en un método de producción de una glucoproteína que tiene una propiedad de glucano preseleccionada.

En un caso, dicha búsqueda se basa en una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo de un producto de glucoproteína diana, y dicho resultado de búsqueda incluye uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción a partir de la base de datos que se correlaciona con la propiedad de glucano seleccionada.

35 En un caso, dicha búsqueda se basa en uno o más parámetros de producción de la base de datos que se correlaciona con una propiedad de glucano seleccionada, y dicho resultado de búsqueda se basa en una propiedad de glucano correlacionada con dicho parámetro o parámetros de producción.

40 En un caso, dicha interfaz de usuario se configura para permitir la entrada de una propiedad de glucano deseada, y dicho procesador se configura para permitir la salida de un resultado de búsqueda basado en un parámetro de producción correlacionado.

En un caso, dicha interfaz de usuario se configura para permitir la entrada de un parámetro de producción deseado, y dicho procesador se configura para permitir la salida de un resultado de búsqueda basado en una propiedad de glucano correlacionada.

45 En un caso, dicho sistema está configurado para permitir la entrada de uno o más valores de X y la salida, por ejemplo un resultado de búsqueda, de uno o más valores de Y, en el que una función correlativa en dicha base de datos relaciona X con Y, en el que X es un valor para un elemento relacionado con un parámetro de producción, e Y es un valor para un elemento relacionado con la propiedad de glucano, y dicho sistema está configurado para el ajuste del valor para X para seleccionar o identificar un valor para Y.

50 En un caso, dicho sistema está configurado para permitir la entrada de uno o más valores de Y y la salida de uno o más valores de X, en el que una función correlativa en dicha base de datos relaciona X con Y, en el que X es un

valor para un elemento relacionado con un parámetro de producción, e Y es un valor para un elemento relacionado con la propiedad de glucano, y el sistema está configurado para el ajuste del valor para Y para seleccionar o identificar un valor para X.

5 En un caso, un parámetro 1 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X1 y la salida o ajuste (o valor) para Y1 variará con el ajuste (o valor) de X1, un parámetro 2 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X2 y la salida o ajuste (o valor) para Y2 variará con el ajuste (o valor) de X2.

En un caso, cierta combinación de valores o ajustes para X1 y X2, o Y1 e Y2, no es compatible y el espacio de solución, o número total de posibilidades para las combinaciones disponibles de Y1 e Y2, es menor que el producto del número de posibilidades para Y1 y el número de posibilidades para Y2 (o la situación análoga para X1X2).

10 En un caso, se impone una restricción sobre el espacio de solución por incompatibilidades en las combinaciones de X1 y X2, por ejemplo pueden ser concentraciones de aditivos o combinaciones de aditivos y células que no se pueden combinar por una razón u otra.

15 En un caso, se impone una restricción en el espacio de solución debido a que una combinación de Y1 e Y2 es sintética o estructuralmente imposible o da como resultado toxicidad al cultivo celular o a una propiedad indeseada en una glucoproteína.

En un caso, una función correlativa produce una salida nula o una señal que corresponde a una combinación no disponible.

En un caso, dicho sistema se configura con un filtro que identifica combinaciones prohibidas o no disponibles de X1X2 o Y1Y2 y las etiqueta o las elimina de la salida.

20 En un caso, se realizará una selección de un valor para el parámetro X2 basándose al menos en parte en el valor escogido para X1.

En un caso, el sistema está implantado por ordenador.

En un caso, el sistema no está implantado por ordenador.

25 En un caso, el sistema incluye una función correlativa que es una correlación ajustable, no lineal, pleiotrópica, o constreñida.

Funciones correlativas

30 Algunos de los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí se refieren a funciones correlativas. La siguiente sección proporciona detalles adicionales, casos específicos y alternativas para las funciones correlativas. Estos no son limitantes sino más bien ejemplares. Opcionalmente se puede incorporar en métodos, bases de datos, o sistemas descritos aquí.

Funciones correlativas ajustables

35 Una función ajustable puede permitir una pluralidad de entradas, por ejemplo entradas de magnitudes diferentes, y una pluralidad de salidas, por ejemplo de magnitud diferente. Puede permitir el ajuste de una propiedad de glucano mediante el ajuste de un parámetro de producción. De este modo, en un caso, una función correlativa es una función ajustable. A título de ejemplo, una función correlativa relaciona X con Y, en la que X es un valor para un elemento relacionado con un parámetro de producción, e Y es un valor para un elemento relacionado con la propiedad de glucano y permite el ajuste del valor para X para seleccionar o identificar un valor para Y o el ajuste del valor para Y para seleccionar o identificar un valor para X. A título de ejemplo, X puede ser cualquiera de un valor para concentración de un aditivo, un valor de un subproducto, un valor de un parámetro físico, un valor de tiempo, un valor de tipo celular, un valor de nivel de expresión génica de número de copias, y, en uno o más de esos casos, Y puede ser la cantidad de una estructura de glucano en una glucoproteína.

40 En un caso, un parámetro 1 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X1 y la salida o ajuste (o valor) para Y1 variará con el ajuste (o valor) de X1, un parámetro 2 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X2 y la salida o ajuste (o valor) para Y2 variará con el ajuste (o valor) de X2. En algunos casos, alguna combinación de valores o ajustes para X1 y X2, o Y1 e Y2, no es compatible, y el espacio de solución, o número total de posibilidades para las combinaciones disponibles de Y1 e Y2, es menor que el producto del número de posibilidades para Y1 y el número de posibilidades para Y2 (o la situación análoga para X1X2).

45 En algunos casos, se impone una restricción en el espacio de solución por incompatibilidades en las combinaciones de X1 y X2, por ejemplo pueden ser concentraciones de aditivos o combinaciones de aditivos y células que no se pueden combinar por una razón u otra.

50 En algunos casos, se impone una restricción en el espacio de solución debido a que una combinación de Y1 e Y2 es sintética o estructuralmente imposible o da como resultado toxicidad al cultivo celular o a una propiedad indeseada

en una glucoproteína. En algunos casos, una función correlativa produce una salida nula o una señal que corresponde a una combinación no disponible.

Funciones correlativas no lineales

5 Una correlación no lineal puede reflejar una relación entre parámetros de producción y propiedades de glucano, en la que el efecto de dos (o más) parámetros de producción que actúan juntos sobre una propiedad de glucano no es el mismo que la combinación del primer parámetro de producción (que actúa solo) sobre la propiedad de glucano junto con el efecto del segundo parámetro de producción (que actúa solo) sobre la propiedad de glucano. Esto se puede expresar como $X_1, X_2 - Y_1 \neq X_1 - Y_1 + X_2 - Y_1$, en la notación usada aquí.

10 En algunos casos, una función correlativa relaciona valores para más de un valor para parámetros de producción (por ejemplo, X_1 , X_2 , etc.) con una o más propiedades de glucano, por ejemplo Y , y en la que el efecto de la combinación, por ejemplo la combinación de X_1 y X_2 , sobre Y no es lineal. La correlación no es lineal cuando el efecto de una pluralidad de parámetros de producción que actúan juntos, por ejemplo los parámetros de producción X_1 y X_2 (que actúan juntos), sobre una o más propiedades de glucano, por ejemplo Y , no es el mismo que la combinación de X_1 (que actúa solo) sobre Y junto con el efecto de X_2 (que actúa solo) sobre Y . A título de ejemplo, la adición de glucosamina (X_1) da como resultado una disminución de la galactosilación (Y_1), una disminución en la fucosilación (Y_2), un incremento en estructuras con contenido elevado de manosa (Y_3), y un incremento en estructuras híbridas (Y_4). La adición de uridina (X_2) da una disminución de estructuras con contenido elevado de manosa (Y_3) pero ningún cambio de las otras propiedades de glucano (Y_1 , Y_2 , e Y_4). Si se combinan la glucosamina (X_1) y la uridina (X_2), los cuatro parámetros Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 , permanecen sin cambio. De este modo, la función correlativa entre X_1 , X_2 e Y_1 no es lineal. Igualmente, la función correlativa entre X_1 , X_2 e Y_2 no es lineal, y la función correlativa entre X_1 , X_2 e Y_4 no es lineal. En algunos casos, las correlaciones X individuales, que son no lineales cuando se toman juntas, también son consideradas, como no lineales. Por ejemplo, en el ejemplo dado inmediatamente antes, la correlación de glucosamina (X_1) con galactosilación (Y_1), la correlación de glucosamina (X_1) con fucosilación (Y_2), y la correlación de glucosamina (X_1) con estructuras híbridas (Y_4) son todas ellas no lineales. De forma similar, la correlación entre uridina (X_2) con galactosilación (Y_1), la correlación de uridina (X_2) con fucosilación (Y_2), y la correlación de uridina (X_2) con estructuras híbridas (Y_4) son consideradas en algunos casos correlaciones no lineales.

Funciones correlativas constreñidas

30 Las funciones correlativas constreñidas reflejan la complejidad de la síntesis de glucoproteínas, y pueden representar relaciones caracterizadas por combinaciones o parámetros de producción o propiedades de glucano incompatibles o indeseables. Por ejemplo, una combinación de parámetros de producción puede estar constreñida debido a que da como resultado una propiedad de glucano indeseable. En algunos casos, una función correlativa relaciona un valor para un primer parámetro de producción X_1 con un primer valor para una primera propiedad de glucano Y_1 , pero también identifica cualquiera de o ambos de: una propiedad de glucano adicional Y_2 , por ejemplo una segunda propiedad, que es alterada por X_1 ; y un parámetro de producción adicional X_2 , por ejemplo un segundo parámetro, que se puede usar junto con el primer parámetro de producción, por ejemplo, para modular, por ejemplo minimizar, el efecto global sobre una segunda propiedad de glucano Y_2 . Esta correlación se denomina como un parámetro de producción constreñido, debido a que el uso de X_1 puede requerir el uso de X_2 así como para evitar un efecto indeseado sobre la propiedad de glucano Y_2 . En casos, la selección de un primer parámetro de producción puede constreñir la selección de un segundo parámetro de producción, y hace a la selección de un segundo parámetro de producción específico más o menos favorecida, debido, por ejemplo, a un efecto positivo o negativo sobre la adjudicación de una propiedad de glucano en la proteína si el segundo parámetro se combina (o no) con el primero. A título de ejemplo, la adición de glucosamina, X_1 , está correlacionada con una disminución en la galactosilación. X_1 también está correlacionado con un incremento en un contenido elevado de manosa. La adición de uridina, X_2 , minimiza el incremento en el contenido elevado de manosa sin abolir la disminución en la galactosilación mediada por X_1 . Si se desea una disminución en la galactosa pero no se desea un incremento en el contenido elevado de manosa, entonces se constriñe X_1 . La correlación $X_1 - Y_1$ o una correlación $X_1 - Y_1, Y_2$ puede identificar X_2 como un parámetro de producción adicional para ser considerado o alterado conjuntamente con X_1 .

Funciones correlativas pleyotrópicas

50 Las funciones correlativas pleyotrópicas pueden reflejar el efecto variado de uno o más parámetros de producción sobre diferentes características de glucano. En algunos casos, una función correlativa relaciona X con una pluralidad de propiedades de glucano, y la relación es pleyotrópica. Por ejemplo, cuando X es un valor para un elemento relacionado con un parámetro de producción, e Y_1 e Y_2 (y opcionalmente Y_3 , Y_4 , Y_5 , etc.) son cada uno valores para elementos relacionados con las propiedades de glucano, el parámetro de producción X confiere efectos diferentes (en un caso, estos efectos son en direcciones diferentes, por ejemplo uno aumenta y el otro disminuye, en oposición a uno cambia, por ejemplo aumenta o disminuye, y el otro queda sin cambio) sobre al menos dos propiedades de glucano. A título de ejemplo, el parámetro de producción X , la adición de glucosamina a los medios, está correlacionado con una reducción en la galactosilación (por ejemplo, Y_1), reducción en la fucosilación (por ejemplo, Y_2), un incremento en el contenido elevado de manosa (por ejemplo, Y_3) y un incremento en estructuras híbridas (por ejemplo, Y_4).

Análisis de glucoproteínas

Algunos de los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí incluyen o se refieren a etapas adicionales, por ejemplo etapas en las que se analiza además un producto de glucoproteína. Algunos casos preferidos específicos de estos métodos, sistemas y bases de datos se proporcionan más abajo.

5 En un caso, un método incluye además analizar una secuencia de aminoácidos, por ejemplo la del producto de glucoproteína primaria, producido bajo dicha combinación seleccionada de parámetros de producción, y compararla con un criterio preseleccionado, por ejemplo la presencia, ausencia o nivel de una propiedad de glucano preseleccionada, por ejemplo característica de glucano. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos tiene una relación preseleccionada con el criterio, por ejemplo satisface o no cumple dichos criterios, seleccionando la
10 combinación. En un caso, un método incluye además alterar las condiciones de las combinaciones seleccionadas, por ejemplo alterando el medio de crecimiento, basado en si la glucoproteína muestra la relación preseleccionada.

15 En un caso, un método incluye además analizar la glucoproteína producida bajo una combinación seleccionada, y compararla con un criterio preseleccionado, por ejemplo que tenga una propiedad de glucano preseleccionada, por ejemplo una estructura de glucano. Si, por ejemplo, la glucoproteína tiene una relación preseleccionada con dicho criterio preseleccionado, por ejemplo satisface o no cumple dicho criterio, el método incluye seleccionar la combinación o glucoproteína producida mediante la combinación para el análisis posterior, por ejemplo alteración de otro parámetro, por ejemplo alterando el medio de crecimiento.

20 En un caso, un método incluye además ensayar el producto de glucoproteína obtenido mediante el método de producción para ver si tiene una propiedad química, biológica o farmacocinética preseleccionada. Por ejemplo, el método puede incluir comparar una propiedad química, biológica o farmacocinética o farmacodinámica preseleccionada de la glucoproteína obtenida mediante el procedimiento de producción con un estándar preseleccionado, y si el valor para dicho producto de glucoproteína tiene una relación preseleccionada con el estándar preseleccionado seleccionando dicho producto de glucoproteína.

25 En un caso, una propiedad de un producto de glucoproteína se compara con una propiedad de un producto de glucoproteína primaria.

30 Los casos de métodos descritos aquí incluyen analizar un producto de glucoproteína, por ejemplo un producto de glucoproteína primaria para propiedades de glucano, por ejemplo características de glucano. Este análisis se puede usar como una guía para seleccionar parámetros de producción o en la producción de una glucoproteína. El análisis se puede basar en la información producida liberando estructuras de glucano a partir de la glucoproteína. En este contexto, liberación significa liberación de toda o al menos alguna porción de aminoácidos de la glucoproteína. A título de ejemplo, el método puede usar digestión enzimática completa o parcial para liberar estructuras de glucano, por ejemplo como sacáridos individuales o fragmentos más grandes, a partir de una glucoproteína. Las estructuras de glucano liberadas se pueden analizar, por ejemplo, proporcionando un patrón de glucano, y comparándolo con un estándar predeterminado, por ejemplo un patrón de glucano de referencia. Un patrón de glucano, como se usa aquí, es una representación de la presencia (o ausencia) de una o más propiedades de glucano. En algunos casos, el patrón de glucano proporciona una determinación cuantitativa de una o más propiedades de glucano. La determinación cuantitativa se puede expresar en términos absolutos o como función de un estándar, por ejemplo un estándar exógeno, o como función de otra propiedad de glucano en el patrón. Los elementos de un patrón de glucano pueden ser, a título de ejemplo, picos u otras fracciones (que representan una o más especies) a partir de una estructura de glucano derivada de una glucoproteína, por ejemplo a partir de una digestión enzimática. Los elementos se pueden describir, por ejemplo, en términos estructurales definidos, por ejemplo mediante nombre químico, o mediante una propiedad funcional o física, por ejemplo mediante el peso molecular o mediante un parámetro relacionado con la purificación o separación, por ejemplo el tiempo de retención en una columna u otro dispositivo de separación. Los métodos descritos aquí se pueden usar para obtener una glucoproteína que tiene propiedades de glucano deseadas. Esto incluye el diseño de un procedimiento para obtener tal glucoproteína o su producción. El análisis se puede usar para determinar o confirmar que una glucoproteína tiene propiedades de glucoproteína seleccionadas. A título de ejemplo, los métodos descritos aquí se pueden usar para monitorizar procedimientos de producción y para seleccionar parámetros de producción para refinar un procedimiento que produce producto que no cumple un estándar, por ejemplo no posee una propiedad de glucano seleccionada.

50 En un caso, un método incluye además seleccionar dicho producto de glucoproteína para la clasificación, aceptación o rechazo, liberación o retención, procesamiento en un producto farmacéutico, transporte, para moverlo a una nueva localización, formulación, etiquetado, envasado, venta en el comercio, para ser vendido, u ofrecido para la venta, o su presentación si la información sobre el producto de glucoproteína a un tercero para su revisión o aprobación, dependiendo de si se cumple el criterio preseleccionado.

55 En un caso, en el momento de diseñar o usar el método de producción, el diseñador o usuario ha investigado, por ejemplo consultando un listado gubernamental o comercial de patentes, en busca de la existencia de una patente de los Estados Unidos de América que cubra el producto de glucoproteína de referencia, o un método para obtener o usar el producto de glucoproteína de referencia.

En un caso, un método incluye además una etapa, por ejemplo antes de la etapa ii de un método aquí, de analizar un producto de glucoproteína diana para identificar una propiedad de glucano diana.

5 En un caso, un método incluye además expresar la secuencia de aminoácidos de dicho producto de glucoproteína primaria bajo dicha condición o condiciones seleccionadas, y determinar si la condición o condiciones seleccionadas se correlacionan positivamente con la presencia de la propiedad condicionada al glucano diana en la glucoproteína.

Cualquiera de los métodos descritos aquí puede incluir una o más de las siguientes etapas:

10 evaluar el producto de glucoproteína, por ejemplo evaluar parámetros fisicoquímicos del producto de glucoproteína, por ejemplo midiendo la masa (por ejemplo, usando SDS-PAGE o cromatografía de exclusión molecular), pl, contenido de hidratos de carbono, cartografiado peptídico, concentración proteica, actividad biológica del producto de glucoproteína;

registrar la evaluación de uno o más parámetros del producto de glucoproteína, por ejemplo proporcionando un certificado de análisis para el producto de glucoproteína;

15 evaluar contaminantes del procedimiento de la glucoproteína o su cultivo celular, por ejemplo incluyendo pero sin limitarse a contenido de endotoxinas, ensayo de esterilidad, contenido de micoplasma, lixiviados, contaminantes de ADN o proteínas de la célula hospedante (por ejemplo CHO);

registrar los contaminantes del procedimiento de la glucoproteína o su cultivo celular;

medir los parámetros del procedimiento del cultivo celular de glucoproteína, incluyendo pero sin limitarse al pH de la producción, viabilidad celular, producción, título, rendimiento, tiempo de multiplicación por dos, densidad óptica (DO), y temperatura;

20 registrar los parámetros del procedimiento del cultivo celular;

evaluar y registrar los componentes de los medios del procedimiento, incluyendo la fuente de materias primas y números de lote de los materiales;

25 medir los parámetros del procedimiento de purificación de la glucoproteína, incluyendo, pero sin limitarse a, el caudal, pH, temperatura, rendimiento, contaminantes del procedimiento, volumen de la columna, o volumen de elución;

registrar los parámetros del procedimiento de purificación; y

registrar un número de lote de un lote de glucoproteína obtenido a partir de un procedimiento descrito aquí.

Selección de parámetros de producción y propiedades de glucano

30 Algunos de los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí incluyen o se refieren a la selección, o al uso, de una propiedad de glucano o un parámetro de producción. Más abajo se proporcionan algunos casos específicos de estos métodos, sistemas y bases de datos.

En un caso, por ejemplo en la etapa iii de un método aquí, se selecciona secuencialmente una pluralidad de parámetros de producción o su combinación.

35 En un caso, por ejemplo en la etapa ii de un método aquí, el método incluye identificar al menos 2, 3, 4 ó 5 propiedades de glucano diana.

En un caso, por ejemplo en la etapa iii de un método aquí, el método incluye seleccionar una combinación de parámetros de producción, combinación la cual se correlaciona con una propiedad de glucano diana.

En un caso, por ejemplo en una combinación de al menos 1 ó 2 parámetros de producción primarios o al menos 1 ó 2 parámetros secundarios o al menos un parámetro primario y un parámetro secundario son seleccionados.

40 En un caso, se selecciona un parámetro de producción para conferir una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad funcional, que difiere de la propiedad de glucano correspondiente de un producto de glucoproteína primaria.

En un caso, una propiedad de glucano es una propiedad funcional de una glucoproteína, por ejemplo semivida sérica, afinidad de unión al receptor, o inmunogenicidad (en un caso, es distinta de inmunogenicidad).

45 En un caso, una propiedad de glucano es una característica de glucano, es decir, una propiedad estructural. Las características de glucano ejemplares incluyen: la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química; la presencia, ausencia o cantidad de un componente de una unidad química (por ejemplo, un sulfato, un fosfato, acetato); heterogeneidad o microheterogeneidad en un sitio de glucosilación potencial o a lo largo de toda la proteína, por ejemplo el grado de ocupación de sitios de glucosilación potenciales de una proteína (por ejemplo, el

5 grado de ocupación del mismo sitio de glucosilación potencial entre dos o más de las cadenas principales proteicas particulares en un producto de glucoproteína y el grado de ocupación de un sitio de glucosilación potencial en una cadena principal de proteína con relación a un sitio de glucosilación potencial diferente en la misma cadena principal proteica); la estructura central de un glucano ramificado (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de estructuras de GlcNAc o de fosfomanosa que se bisecan) o no ramificado; la presencia, ausencia o cantidad de una estructura de glucano (por ejemplo, una estructura compleja (por ejemplo, biantenaria, triantenaria, tetraantenaria, etc.), una estructura con contenido elevado de manosa o una estructura de glucano híbrida); la posición relativa de una unidad química en un glucano (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química terminal o penúltima); y la relación entre unidades químicas (por ejemplo, enlazamientos entre unidades químicas, isómeros y puntos de ramificación).

10 En un caso, una propiedad de glucano diana se selecciona del grupo que consiste en: galactosilación, fucosilación, contenido elevado de manosa, sialilación, y sus combinaciones.

15 En un caso, al menos se seleccionan secuencialmente 1, 2, 3, 4 o más parámetros de producción, por ejemplo cada uno se selecciona en base a una correlación entre un único parámetro de producción y una característica de glucano.

20 En un caso, entre la selección de un primer parámetro de producción y la selección de un segundo parámetro de producción, el primer parámetro de producción se ensaya para determinar la capacidad para conferir una propiedad de glucano seleccionada (por ejemplo, una característica de glucano correlacionada con el primer parámetro de producción mediante la base de datos) en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo la secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína primaria.

25 En un caso preferido, entre la selección de un segundo parámetro de producción y un tercer parámetro de producción, el segundo parámetro de producción se ensaya para determinar la capacidad para conferir una propiedad de glucano seleccionada (por ejemplo, una característica de glucano correlacionada con el segundo parámetro de producción mediante la base de datos) en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo la secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína primaria.

En un caso, se seleccionan simultáneamente 2, 3, 4 o más parámetros de producción, por ejemplo se selecciona una combinación de parámetros de producción en base a una correlación entre la combinación de parámetros de producción y una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano.

30 En un caso, un método incluye, por ejemplo, en la etapa iii:

seleccionar, de manera secuencial,

35 i) un primer parámetro de producción, por ejemplo un parámetro de producción primario, por ejemplo un parámetro relacionado con una estirpe celular, una variable de procedimiento o de biorreactor, por ejemplo discontinuo, discontinuo alimentado, o perfusión, un procedimiento de purificación o una formulación, a partir de dicha base de datos, incluyendo dicha base de datos una correlación entre dicho primer parámetro de producción y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida en un procedimiento que incluye dicho primer parámetro de producción; y

40 ii) un segundo parámetro de producción, por ejemplo un parámetro de producción secundario, a partir de dicha base de datos, incluyendo dicha base de datos una correlación entre dicho parámetro de producción secundario y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida en un procedimiento que incluye dicho parámetro de producción secundario.

En un caso, un método incluye la selección de 1, 2, 3 o más parámetros de producción primarios interespaciada con o seguida de la selección de 1, 2, 3 o más parámetros de producción secundarios.

45 En un caso, una etapa en el método de producción se determina seleccionando un parámetro de producción que está correlacionado con la producción de glucoproteína que tiene dicha propiedad de glucano preseleccionada, por ejemplo una característica de glucano, a partir de una base de datos.

50 En un caso, una etapa en el método de producción se determina seleccionando un parámetro de producción a partir de una base de datos en la que cada uno de una pluralidad de parámetros de producción, o combinaciones de parámetros de producción, por ejemplo al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40 o más parámetros o combinaciones de parámetros, está correlacionado con la producción de glucoproteína que tiene dicha propiedad de glucano preseleccionada, por ejemplo una característica de glucano, cuando dicho parámetro o combinación de parámetros se incorpora en un método para obtener el producto de glucoproteína.

En un caso, se selecciona un parámetro de producción para conferir una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad funcional, que es la misma que o similar a la propiedad de glucano correspondiente de dicho producto de glucoproteína primaria.

En un caso, el método de producción es diferente de un método publicado para obtener dicho producto de glucoproteína primaria.

5 En un caso, se selecciona un parámetro de producción que está correlacionado con la adjudicación en una secuencia de aminoácidos de una característica de glucano, encontrada en el producto de glucoproteína, o está correlacionado con una característica de glucano, que es un intermedio y que está correlacionado positivamente con la presencia (eventual) en el producto de glucoproteína expresado de una característica de glucano seleccionada.

En un caso, se selecciona un parámetro de producción para conferir una propiedad de glucano diana, por ejemplo una propiedad funcional, que difiere de la propiedad de glucano correspondiente de dicho producto de glucoproteína primaria.

10 En un caso, un método incluye seleccionar las propiedades de glucano requeridas por el producto de glucoproteína, y seleccionar después los parámetros de producción, por ejemplo los seleccionados en d) de un método descrito aquí, para proporcionar las propiedades de glucano requeridas.

En un caso, un método incluye seleccionar una combinación de parámetros de producción, combinación la cual se correlaciona con una propiedad de glucano diana.

15 Glucoproteínas ejemplares y propiedades

Algunos de los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí incluyen o se refieren a un producto de glucoproteína mejorado, la selección de un método para obtener un producto de glucoproteína mejorado, o un método para obtener un producto de glucoproteína mejorado. Más abajo se proporcionan algunos casos preferidos específicos de estos métodos, sistemas y bases de datos.

20 En un caso, el producto de glucoproteína es un producto de glucoproteína alterado (o de siguiente generación) que tiene una propiedad de glucano preseleccionada, y en el que la etapa b) incluye:

25 seleccionar una o una pluralidad de propiedades de glucano como dicha propiedad o propiedades de glucano diana, y en el que dicha propiedad o propiedades de glucano diana son diferentes de la propiedad o propiedades de glucano correspondientes de dicho producto de glucoproteína primaria, por ejemplo difieren en la afinidad por un receptor o el grado de heterogeneidad de estructuras de glucano unidas a un sitio preseleccionado.

En un caso, el método de producción da como resultado un producto de glucoproteína que tiene característica o características de glucano diferentes de dicha diana de glucoproteína primaria.

En un caso, la propiedad de glucano diana es la semivida sérica, que es más prolongada o más corta que la semivida sérica del producto de glucoproteína primaria.

30 En un caso, una propiedad de glucano diana es la semivida sérica, que es más prolongada o más corta que la semivida sérica del producto de glucoproteína primaria.

Algunos de los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí incluyen o se refieren al análisis de un producto de glucoproteína primaria. Más abajo se proporcionan algunos casos preferidos específicos de estos métodos, sistemas y bases de datos.

35 En un caso, un método incluye proporcionar información que resulta de someter al producto de glucoproteína primaria a uno o más del método analítico descrito aquí, para proporcionar una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano. El método analítico se puede aplicar a una o una pluralidad de muestras del producto de glucoproteína primaria, por ejemplo producto de glucoproteína primaria comercialmente disponible. El método analítico se puede aplicar a uno o una pluralidad de lotes de producción del producto de glucoproteína primaria, por ejemplo producto de glucoproteína primaria comercialmente disponible.

40 En un caso, el producto de glucoproteína primaria y el producto de glucoproteína tienen secuencia de aminoácidos idénticas.

En un caso, el producto de glucoproteína primaria y el producto de glucoproteína difieren en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 20 restos de aminoácidos.

45 En un caso, el producto de glucoproteína primaria se selecciona de la Tabla I.

Bases de datos: Casos adicionales

Las bases de datos, y los métodos y sistemas que incluyen el uso de una base de datos, se describen aquí. Más abajo se proporcionan algunos casos preferidos específicos de estas bases de datos.

50 En casos preferidos, una base de datos tiene al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 registros de correlaciones.

En un caso, una base de datos proporciona:

una correlación entre un primer parámetro de producción (o combinación de parámetros de producción) y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un procedimiento que incluye dicho primer parámetro;

- 5 una correlación entre un segundo parámetro de producción (o combinación de parámetros de producción) y la adjudicación de dicha propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un procedimiento que incluye dicho segundo parámetro de producción; y

la base de datos se configura para permitir la elección entre el primer y el segundo parámetro.

En un caso, una base de datos proporciona:

- 10 una correlación entre el uso de la combinación de un primer y un segundo parámetro de producción (o las combinaciones respectivas) en un procedimiento para obtener dicho producto de glucoproteína en la adjudicación de dicha característica de glucano seleccionada en una proteína obtenida mediante dicho procedimiento de combinación;

- 15 y permite la provisión de información sobre el efecto de la adición del primer o segundo parámetro de producción (o combinaciones respectivas) sobre el otro parámetro de producción (o combinación respectiva) en términos de adición de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo característica de glucano, a una proteína.

En un caso, una base de datos se configura para permitir tomar una decisión sin incluir el primer, el segundo, o ambos parámetros de producción, en la producción de un producto de glucoproteína.

- 20 En un caso, una base de datos se configura para permitir la apreciación de que la selección de un primer parámetro de producción restringe la selección de un segundo parámetro de producción y hace a la selección de un segundo parámetro de producción específico más o menos favorecida, debido, por ejemplo, a un efecto positivo o negativo sobre la adjudicación de una propiedad de glucano en la proteína si el segundo parámetro se combina con el primero.

- 25 En un caso, la base de datos incluye una, dos, tres, o todas de una correlación ajustable, no lineal, pleiotrópica, o constreñida.

En un caso, una base de datos incluye:

- i) una correlación entre un primer y un segundo parámetro de producción y la adjudicación de una primera característica de glucano seleccionada en una proteína obtenida mediante un método que incluye dicho primer y segundo (pero no un tercer) parámetro de producción;

- 30 ii) una correlación entre dicho primer y tercer parámetros de producción y la adjudicación de dicha primera característica de glucano seleccionada en una proteína obtenida mediante un método que incluye dicho primer y tercer (pero no dicho segundo) parámetro de producción;

- 35 y permite la comparación de (1) la presencia, en una proteína obtenida mediante un método que incluye el primer y segundo (pero no dicho tercer) parámetro de producción, de una primera característica de glucano seleccionada con (2) la presencia, en una proteína obtenida mediante un método que incluye el primer y el tercer pero no el segundo parámetro de producción,

y permite además una elección entre la combinación de i y la combinación de ii en base a la optimización de la presencia de dicha primera característica de glucano seleccionada.

En un caso, una base de datos incluye:

- 40 correlaciones, cada una de una pluralidad de especies, de un primer parámetro de producción genérico, por ejemplo variantes de un tipo celular, por ejemplo una pluralidad de células CHO que tienen diferentes sitios de inserción, número de copias de inserción, o genes relacionados con la glucosilación, con la adjudicación de una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un método que incluye el uso de las especies; y

- 45 correlaciones, cada una de una pluralidad de especies, de un segundo parámetro de producción genérico, por ejemplo variantes de fermentación, por ejemplo una pluralidad de condiciones de fermentación tales como densidad celular, procedimiento por lotes, procedimiento por perfusión, procedimiento continuo, con la adjudicación de una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un método que incluye el uso de las especies.

- 50 En un caso, una base de datos incluye:

una correlación entre la combinación de una primera especie de un primer parámetro de producción y una primera especie de un segundo parámetro de producción con la adjudicación de una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un método que incluye la combinación;

5 una correlación entre la combinación de una segunda especie de un primer parámetro de producción y la primera o una segunda especie de un segundo parámetro de producción con la adjudicación de una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida mediante un método que incluye la combinación;

10 y permite la comparación (y elección) entre (1) una combinación de una primera especie de un primer parámetro de producción genérico, por ejemplo una célula CHO que tiene inserción en un primer sitio, y una primera especie de un segundo parámetro de producción genérico, por ejemplo fermentación mediante procedimiento por lotes, y (2) una combinación de una especie diferente del primer parámetro de producción genérico, por ejemplo una célula CHO que tiene inserción en un segundo sitio, y una especie del dicho segundo parámetro de producción genérico, por ejemplo fermentación mediante procedimiento continuo.

En un caso, una base de datos incluye:

15 una correlación entre una combinación de parámetros de producción y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida en un procedimiento que incluye dicha combinación de parámetros de producción, por ejemplo en el que la combinación de parámetros de producción incluye una célula y un medio de cultivo.

En un caso, una base de datos incluye:

20 correlaciones entre una célula cultivada bajo cada una de una pluralidad de condiciones de cultivo, por ejemplo dicha célula cultivada en cada uno de un primer, segundo y tercer medio, y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo una característica de glucano, en una proteína obtenida en un procedimiento que incluye dicha célula cultivada en una de dichas condiciones de cultivo, por ejemplo en el que un tipo celular seleccionado, por ejemplo una célula CHO, se puede cultivar en una pluralidad de medios, y cada combinación de célula/condición se correlaciona con la incidencia de la misma o una propiedad de glucano diferente, por ejemplo una característica de glucano.

En un caso, una base de datos incluye:

30 correlaciones entre cada una de una pluralidad de células cultivadas bajo una pluralidad de condiciones, por ejemplo un primer tipo celular cultivado en un primer, un segundo y un tercer medio, un segundo tipo celular cultivado en el primer, segundo y tercer medio, y un tercer tipo celular cultivado en el primer, segundo y tercer medio, y la adjudicación de una propiedad de glucano seleccionada, por ejemplo característica de glucano, en una proteína obtenida en un procedimiento que incluye una combinación de célula/condición.

En un caso, una base de datos incluye una correlación entre cada uno de varios tipos celulares seleccionados, por ejemplo diferentes cepas o genotipos de células CHO, cultivados en una pluralidad de medios (combinaciones de célula/condición) con la incidencia de una propiedad de glucano, por ejemplo una característica de glucano.

35 Productos de glucoproteína ejemplares

En otro caso, la descripción se refiere a un producto o preparación de glucoproteína o una preparación, por ejemplo una preparación farmacéutica, de un producto de glucoproteína, obtenido mediante un procedimiento descrito aquí, por ejemplo un procedimiento para obtener una glucoproteína o un procedimiento para seleccionar las etapas de un método para obtener una glucoproteína.

40 En un caso, el producto de glucoproteína tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína de la Tabla I, o difiere en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 restos de aminoácidos de la proteína de la Tabla I.

En un caso, el producto de glucoproteína difiere en al menos una característica de glucano de la proteína de la Tabla I.

45 En otro caso, la descripción se refiere a un producto de glucoproteína o una preparación, por ejemplo una preparación farmacéutica, de un producto de glucoproteína, que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína de la Tabla I, o difiere en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 restos de aminoácidos de la proteína de la Tabla I, en el que dicho producto de glucoproteína difiere en una o más características de glucano enumeradas en la Tabla II a partir de una preparación comercial de dicha proteína.

50 En un caso, el producto de glucoproteína o la preparación, por ejemplo una preparación farmacéutica, de un producto de glucoproteína tiene uno o más de: más o menos fucosilación, más o menos galactosilación, más o menos estructura con contenido elevado de manosa, estructura más o menos híbrida, más o menos sialilaciones, que lo que tiene la proteína correspondiente de la Tabla I.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para producir una proteína con una cantidad modulada de una característica de glucano seleccionada de la Tabla II modulando un parámetro de producción de la Tabla II, que incluye:

5 seleccionar un nivel de referencia de dicha característica de glucano, por ejemplo el nivel encontrado en una glucoproteína preseleccionada, por ejemplo una glucoproteína diana;

seleccionar un valor para un parámetro a partir de la Tabla II para proporcionar un nivel modulado de dicha característica de glucano (en comparación, por ejemplo, con el nivel de referencia); y

aplicar el parámetro seleccionado en un procedimiento para obtener proteína con una cantidad modulada de dicha característica de glucano.

10 En otro caso, la descripción se refiere a un método para producir una proteína que tiene un nivel preseleccionado de una propiedad funcional o biológica de la Tabla III modulando un parámetro de la Tabla II, que incluye:

seleccionar un nivel de referencia de dicha propiedad biológica, por ejemplo el nivel encontrado en una glucoproteína preseleccionada;

15 seleccionar un valor para un parámetro de la Tabla II para proporcionar un nivel modulado de dicha característica de glucano que modula dicha propiedad biológica;

aplicar el parámetro seleccionado en un procedimiento para obtener proteína con una cantidad modulada de dicha propiedad funcional o biológica.

Casos adicionales de la descripción

20 En otro caso, la descripción se refiere a un producto de programa de ordenador realizado tangiblemente en un soporte de información y que incluye instrucciones que, cuando se ejecutan mediante un procesador, llevan a cabo un método descrito aquí.

25 Los métodos, bases de datos y sistemas descritos aquí se pueden usar con una amplia variedad de glucoproteínas (incluyendo glucopéptidos). Estas incluyen glucoproteínas de origen natural y de origen no natural. Las glucoproteínas representativas incluyen: anticuerpos, por ejemplo IgG, IgM, anticuerpos humanos, humanizados, injertados, y quiméricos, y sus fragmentos; proteínas de fusión, por ejemplo fusiones que incluyen dominios de anticuerpos humanos (o de otros), por ejemplo los dominios de la región Fc o región constante; factores de crecimiento; hormonas; y cualquier clase de proteína representada por una proteína enumerada en la Tabla I.

30 La expresión "base de datos", como se usa aquí, se refiere a una colección de datos. Típicamente, está organizada de manera que sus contenidos pueden ser accedidos, manejados y actualizados fácilmente. En casos preferidos, la base de datos está configurada o está dispuesta para asegurar su integridad y calidad, para minimizar el contenido más allá de los registros descritos aquí, y para permitir el acceso controlado. La base de datos está presentada o memorizada en un medio. El medio puede ser, por ejemplo, un medio de papel tradicional u otro medio que presenta símbolos impresos o escritos que se pueden usar directamente (por ejemplo, sin la ayuda de un ordenador) por un ser humano. Tal base de datos puede existir como un conjunto de tablas impresas, o un catálogo de tarjeta, que, por ejemplo, muestra la relación de parámetro de producción a características de glucano. La base de datos también se puede presentar o memorizar en una forma electrónica u otra forma legible por ordenador. Tales bases de datos pueden oscilar desde hojas de cálculo simples hasta formas más complejas. La base de datos no necesita ser depositada en una única unidad de medio, por ejemplo en una única tabla o libro, o en un único ordenador o red. Una base de datos, por ejemplo, puede combinar un medio tradicional como se describe anteriormente con un medio legible por ordenador. Típicamente, la base de datos contendrá una colección de registros, en la que cada registro relaciona un parámetro de producción con una propiedad de glucano mediante una función correlativa. La base de datos se puede organizar de muchas maneras, por ejemplo como una base de datos relacional. Típicamente, la base de datos está en un formato que permite la búsqueda de información específica o registros mediante técnicas específicas para cada base de datos. Una base de datos de ordenador es típicamente una colección estructurada de registros almacenados en un ordenador u ordenadores, de manera que un programa los puede consultar para responder búsquedas. Las bases de datos relacionales junto con interfaces para búsquedas y resultados de búsquedas son particularmente preferidas. El cartografiado de la ontología de la base de datos relacional permite construir correlaciones útiles en los métodos descritos aquí.

35 Aunque algunos casos de la descripción pueden recuperar información a partir de información públicamente accesible, las bases de datos usadas en tales casos generalmente también incluirán al menos 1, 2, 5, 10, 20 ó 50 correlaciones que no estaban presentes o que no se recuperaron de información públicamente accesible, por ejemplo en tales casos la base de datos puede contener al menos 1, 2, 5, 10, 20, 50 o más correlaciones no lineales, pleyotrópicas, o constreñidas. La información públicamente accesible puede incluir información a partir de una base de datos públicamente accesible tal como PubMed. En un caso, una base de datos descrita aquí contiene al menos 1, 2, 5, 10, 20 ó 50 correlaciones que no están en información públicamente accesible, por ejemplo no están en documentos publicados. La determinación de si una correlación está públicamente accesible, por ejemplo

en un documento publicado o base de datos, se realiza como la fecha de presentación U.S. previa de una solicitud no provisional de la que esta patente reivindica la prioridad.

Los encabezados usados en este documento son para facilidad de lectura, y no se deberían de usar para limitar los casos de la descripción, por ejemplo realizaciones de la invención, descritos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Ahora se describirán los dibujos.

La FIG. 1 es un diagrama de bloques de dispositivos y sistemas de computación.

La FIG. 2 es una representación de un cromatograma representativo de patrones de glucano a partir de IgG humana producida en células CHO. IgG humana se produjo a partir de células CHO, se aisló, se liberaron los glucanos, se aislaron, y se marcaron fluorescentemente, antes de resolver en NP-HPLC.

La FIG. 3 es una representación de los patrones de glucano a partir de IgG humana producida en células CHO en diferentes condiciones de procesamiento. IgG humana se produjo a partir de células CHO cultivadas en presencia de uridina elevada, glucosamina, o ambas. La IgG se aisló, se liberaron los glucanos, se aislaron, y se marcaron fluorescentemente, antes de resolver en NP-HPLC. Un resumen de los datos normalizados para la IgG producida en presencia de uridina elevada, glucosamina, o ambas, se muestra como se indica. Los datos son representativos de determinantes duplicados, y se expresan como un % del área total del pico.

Otros rasgos y ventajas de la invención y la descripción serán manifiestos a partir de la descripción detallada siguiente, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 Propiedades de glucano:

Los métodos descritos aquí incluyen seleccionar uno o más parámetros de producción para producir una glucoproteína que tiene una o más propiedades de glucano preseleccionadas. Una propiedad de glucano, como se usa aquí, se refiere a (1) una propiedad funcional conferida o condicionada por una estructura de glucano en una proteína, o (2) una propiedad estructural (denominada aquí como una "característica de glucano").

Una actividad funcional preseleccionada se puede correlacionar con una característica o características de glucano y, basándose en esa correlación, se puede tomar una decisión con respecto a qué parámetro de producción o combinación de parámetros de producción da como resultado una glucoproteína que tiene la característica de glucano preseleccionada, y, de este modo, actividad funcional. Las actividades que se pueden seleccionar incluyen, pero no se limitan a, semivida sérica, aclaramiento, estabilidad *in vitro* (período de caducidad) o *in vivo*, afinidad de unión, distribución tisular y selección de dianas, toxicidad, inmunogenicidad, velocidad de absorción, velocidad de eliminación, estructura tridimensional, metabolismo y biodisponibilidad.

Una "característica de glucano", como se usa aquí, incluye la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química; la presencia, ausencia o cantidad de un componente de una unidad química (por ejemplo un sulfato, un fosfato, un acetato, un glucolilo, un propilo, u otra modificación de grupo alquilo cualquiera); heterogeneidad o microheterogeneidad en un sitio de glucosilación potencial o a lo largo de toda la proteína, por ejemplo el grado de ocupación de sitios de glucosilación potenciales de una proteína (por ejemplo, el grado de ocupación del mismo sitio de glucosilación potencial entre dos o más de las cadenas principales proteicas particulares en un producto de glucoproteína y el grado de ocupación de un sitio de glucosilación potencial en una cadena principal proteica con relación a un sitio de glucosilación potencial diferente en la misma cadena principal proteica); la estructura de un glucano ramificado (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de estructuras GlcNAc o de fosfomanosa que se bisecan) o no ramificado; la presencia, ausencia o cantidad de una estructura de glucano (por ejemplo, una estructura compleja (por ejemplo, biantenaria, triantenaria, tetraantenaria, etc.), una estructura con contenido elevado de manosa o una estructura de glucano híbrida); la posición relativa de una unidad química en un glucano (por ejemplo la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química terminal o penúltima); el carácter químico del glucano (por ejemplo cantidades y relaciones de los componentes monosacáridos en un glucano particular); y la relación entre unidades químicas (por ejemplo, enlazamientos entre unidades químicas, isómeros y puntos de ramificación). En algunos casos, una característica de glucano puede ser, a título de ejemplo, un pico u otra fracción (que representa una o más especies) de estructuras de glucano derivadas de una glucoproteína, por ejemplo de una digestión enzimática. Una característica de glucano se puede describir, por ejemplo, en términos estructurales definidos, por ejemplo mediante nombre químico, o mediante una propiedad funcional o física, por ejemplo mediante peso molecular o mediante un parámetro relacionado con la purificación o separación, por ejemplo tiempo de retención de un pico en una columna u otro dispositivo de separación.

Una "unidad química", como se usa aquí, es un compuesto químico de carbono, hidrógeno y oxígeno, en el que los átomos de estos dos últimos elementos están en una relación de 2:1. Una unidad química puede ser, por ejemplo, un derivado aldehídico o cetónico de un alcohol polihidroxilado, particularmente alcoholes pentahidroxilados y

hexahidroxilados. Los ejemplos de unidades químicas incluyen monosacáridos tales como galactosa, fucosa, ácido siálico, manosa, glucosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) y ribosa, así como sus derivados y análogos. Se conocen derivados de diversos monosacáridos. Por ejemplo, el ácido siálico engloba alrededor de treinta derivados, formando el ácido N-acetilneuramínico y el ácido N-glucolilneuramínico las estructuras centrales. Los derivados gangliósidos sintéticos se describen en la patente U.S. nº 5.567.684; los sacáridos derivatizados con sialilo bivalentes se describen en la patente U.S. nº 5.559.103. Los derivados y análogos del ácido 2-desoxi-2,3-dideshidro-N-acetilneuramínico se describen en la patente U.S. nº 5.360.817. Los ejemplos de análogos del ácido siálico incluyen aquellos que imitan funcionalmente al ácido siálico, pero no son reconocidos por sialilasas de celdas hospedantes endógenas. Las sialiltransferasas y otras enzimas que están involucradas en el metabolismo del ácido siálico reconocen a menudo sustratos de monosacáridos "no naturales" o "modificados" (Kosa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, 914, 1993; Fitz y Wong, J., *Org. Chem.*, 59, 8279, 1994; Shames et al., *Glycobiology*, 1, 187, 1991; Sparks et al., *Tetrahedron*, 49, 1, 1993; Lin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10138, 1992). Otros ejemplos de análogos de monosacáridos incluyen, pero no se limitan a, N-levulinoil manosamina (ManLev), Neu5Ac α -metil glucósido, Neu5Ac β -metil glucósido, Neu5Ac α -bencilglucósido, Neu5Ac β -bencil glucósido, éster metílico del Neu5Ac α -metil glucósido, éster metílico de Neu5Ac α , ácido 9-O-acetil-N-acetilneuramínico, ácido 9-O-lactil-N-acetilneuramínico, N-azidoacetilmanosamina y sus variaciones O-acetiladas, y Neu5Ac α -etil tioglucósido. Además, en la patente U.S. nº 5.759.823 y en la patente U.S. nº 5.712.254 se enseñan ejemplos de análogos de ácido siálico y métodos que se pueden usar para producir tales análogos.

Los ejemplos de derivados, o análogos, de otros monosacáridos incluyen: derivados amidínicos, amidrazónicos y amidoxímicos de monosacáridos (patente U.S. nº 5.663.355), 1,3,4,6-tetra-O-acetil-N-acilmanosamina o su derivado, análogos o derivados de azúcares o aminoazúcares que tienen 5 ó 6 carbonos en el anillo glucosilílico, incluyendo aldosas, desoxialdosas y cetosas, independientemente de la orientación o configuración de los enlaces de los carbonos asimétricos. Esta incluye unidades químicas tales como ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, idosa, galactosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina, ácido N-acetilneuramínico, fructosa, sorbosa, tagatosa, ramnosa y fucosa. Los análogos y derivados de monosacáridos ejemplares derivados de glucosa, N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa, fucosa y ácido siálico se enseñan, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.759.823.

Una característica de glucano puede incluir la presencia, ausencia o cantidades de diversos derivados o análogos de una unidad química. Por ejemplo, la característica del glucano puede ser la ausencia, presencia o cantidad de ácido N-acetilneuramínico.

Una "estructura de glucano", como se usa aquí, se refiere a al menos dos unidades químicas enlazadas entre sí. Se incluye cualquier enlazamiento, incluyendo enlazamientos covalentes y no covalentes.

Una característica de glucano puede ser además una comparación en la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química, un componente de una unidad química o una estructura de glucano con relación a la presencia, ausencia o cantidad de otra unidad química, otro componente de una unidad química u otra estructura de glucano, respectivamente. Por ejemplo, se puede determinar la presencia, ausencia o cantidad de ácido siálico con relación a la presencia, ausencia o cantidad de fucosa. En otros ejemplos, se puede comparar la presencia, ausencia o cantidad de un ácido siálico, tal como ácido N-acetilneuramínico, por ejemplo, con la presencia, ausencia o cantidad de un derivado de ácido siálico tal como ácido N-glucolilneuramínico.

Una función correlativa, como se usa aquí, proporciona una función que define la relación, por ejemplo en una base de datos, entre uno o más parámetros de producción y una o más propiedades de glucano. En un caso, un parámetro de producción está correlacionado con una propiedad de glucano. La función correlativa puede representar un valor constante, por ejemplo un valor constante positivo en el caso de una correlación positiva entre la presencia o uso de un parámetro de producción y la adjudicación de una propiedad de glucano en una glucoproteína. Algunos casos también incluyen aquellos en los que a cada una de una pluralidad de especies del parámetro de producción (por ejemplo, concentraciones diferentes de un aditivo específico) se le asigna una constante relativa diferente, teniendo cada una un valor constante diferente. Por ejemplo, en el caso de un parámetro de producción tal como glucosamina, que se puede añadir a condiciones de cultivo a diferentes concentraciones, y la propiedad del glucano de tener restos de fucosa, la base de datos podría incluir correlaciones entre la concentración 1 y el nivel 1 de glucano, la concentración 2 y el nivel 2 de glucano, etc. La función correlativa también puede ser "ajutable", por ejemplo puede variar (o su resultado puede variar), por ejemplo de una manera lineal o no lineal, a lo largo de un intervalo de valores de entrada, según una función. Por ejemplo, la función correlativa puede representar una función que relaciona X con Y, en la que X es un valor para algún elemento relacionado con un parámetro de producción, e Y es un valor para algún elemento relacionado con la propiedad de glucano (en algunos casos, X es la entrada e Y es la salida; en otros, Y es la entrada y X es la salida). Por ejemplo, en el caso en el que el parámetro de producción es la presencia de un aditivo, por ejemplo glucosamina, en el medio de cultivo, X es el valor para la concentración de glucosamina añadida al medio de cultivo. Y puede ser un valor para la cantidad de fucosa añadida a una proteína obtenida en un método que usa glucosamina a una concentración X. En este caso, la función correlativa relaciona un valor (por ejemplo un valor de entrada) para la concentración de glucosamina con un valor (por ejemplo, valor de salida) para la cantidad de restos de fucosilo en la glucoproteína. A medida que los valores para X aumentan, los valores para Y cambiarán según la función que relaciona X e Y, y, en el caso de aumentar la glucosamina, el valor de salida disminuirá. De este modo, a medida que la cantidad de

glucosamina aumenta, la función correlativa indica una menor cantidad de fucosilación. Tales funciones correlativas son ajustables en el sentido de que se puede cambiar el valor de X y observar el efecto sobre Y. Esto permite ajustar el parámetro de producción para lograr una propiedad de glucano deseada. El método también permite variar Y para observar el efecto sobre X. Las funciones que relacionan X e Y se pueden determinar, por ejemplo, mediante ensayo empírico. Por ejemplo, en el caso de concentración de glucosamina y cantidad de fucosilación, se puede derivar una función llevando a cabo una serie de ensayos a diferentes concentraciones de glucosamina, representando gráficamente la concentración de glucosamina frente a los niveles observados de fucosilación, y derivando una ecuación que describe la curva de los valores representados gráficamente. En un caso, el parámetro 1 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X1 y el ajuste de salida (o valor) para Y1 variarán con el ajuste (o valor) de X1. El parámetro 2 de producción es ajustable para un ajuste de entrada (o valor) X2 y el ajuste de salida (o valor) para Y2 variarán con el ajuste (o valor) de X2. En algunos casos, el número de combinaciones de Y1 e Y2 es igual al producto del número de posibilidades para Y1 y el número de posibilidades para Y2. Por ejemplo, en una situación en la que hay 10 valores de entrada o ajustes para X1, 10 valores o ajustes de salida para Y1, 10 valores o ajustes de entrada para X2, y 10 valores o ajustes de salida para Y2, hay un total de 100 combinaciones (de X1X2 o Y1Y2) disponibles. En otros casos, algunas combinaciones de valores o ajustes para X1 y X2, o alguna combinación de valores o ajustes para Y1 e Y2, no son compatibles; cualquier caso da como resultado un espacio de solución, o número total de posibilidades para las combinaciones disponibles de Y1 e Y2 que es menor que el producto del número de posibilidades para Y1 y el número de posibilidades para Y2 (o la situación análoga para X1X2). Esta restricción puede estar impuesta por incompatibilidades en las combinaciones de X1 y X2, por ejemplo puede haber concentraciones de aditivos o combinaciones de aditivos y células que no se pueden combinar por una razón u otra. La restricción también puede estar impuesta debido a que una combinación de Y1 e Y2 son sintética o estructuralmente imposibles, o dar como resultado toxicidad al cultivo celular o una propiedad indeseada en una glucoproteína. Una restricción por ejemplo una restricción física o biológica, en el espacio de solución se puede determinar o elucidar, por ejemplo, mediante experimentación empírica. La restricción del espacio de solución (para X1X2 o Y1Y2) se puede lograr en una base de datos o sistema de diferentes maneras. Por ejemplo, la función correlativa se puede diseñar para producir una salida nula o una señal que corresponde a una combinación no disponible. Esto no necesita ser absoluto, pero se podría expresar en grados de indeseabilidad. Un sistema se podría configurar con un filtro que identifique combinaciones prohibidas o no disponibles y las marque o las elimine del resultado. El filtro se podría proporcionar con combinaciones inaceptables específicas o un algoritmo a base de reglas para la exclusión de combinaciones inaceptables. En los métodos, sistemas y bases de datos descritos aquí se pueden usar correlaciones no lineales, constreñidas y pleiotrópicas.

Una función correlativa, generalmente, es el grado en el cual un fenómeno o variable aleatoria (por ejemplo, parámetro de producción, función de glucoproteína, etc.) está asociado con o se puede predecir a partir de otro. En estadística, la correlación se refiere habitualmente al grado en el que existe una relación predictiva lineal entre variables aleatorias, según se mide mediante un coeficiente de correlación. La correlación puede ser positiva (pero nunca mayor que 1), es decir, ambas variables aumentan o disminuyen juntas; negativa o inversa (pero nunca menor que -1), es decir, una variable aumenta cuando la otra disminuye; o cero, es decir, un cambio en una variable no afecta a la otra.

Junto con las funciones de correlación (por ejemplo, autocorrelaciones, correlaciones cruzadas, etc.), se puede usar uno o más procesos estocásticos, teorías o técnicas de variables aleatorias, o teorías de probabilidad para identificar y seleccionar características de glucoproteína, parámetros de producción, u otro fenómeno o variables aleatorias y sus relaciones. Por ejemplo, se pueden implementar funciones de covarianza, funciones de generalización, funciones de distribución, funciones de densidad de probabilidad, u otros tipos de representaciones matemáticas.

Productos de glucoproteína primaria

Los métodos descritos aquí incluyen identificar un producto de glucoproteína primaria tal como un producto de origen natural u obtenido sintéticamente, y producir un producto de glucoproteína que tiene una o más propiedades de glucano preseleccionadas. Un producto de glucoproteína primaria, como se usa aquí, se refiere a una glucoproteína. La glucoproteína puede servir como un modelo, punto de partida o punto intermedio para diseñar un producto de glucoproteína. Puede proporcionar o mostrar una propiedad de glucoproteína deseada. De este modo, en algunos casos, las propiedades de glucano preseleccionadas pueden ser las mismas o sustancialmente similares a las propiedades de glucano preseleccionadas del producto de glucoproteína primaria (por ejemplo, para obtener una versión genérica de un producto de glucoproteína primaria), o pueden ser una o más propiedades de glucano que difieren de la propiedad de glucano correspondiente del producto de glucoproteína primaria (por ejemplo, para obtener un producto de glucoproteína de segunda generación). En la Tabla I a continuación se proporcionan productos de glucoproteína primaria ejemplares.

Tabla I

Producto proteico	Fármaco enumerado de referencia
interferón gamma-1b	Actimmune®
Alteplasa; activador de plasminógeno tisular	Activase®/Cathflo®
factor antihemofílico recombinante	Advate
Albúmina humana	Albutein®
Laronidasa	Aldurazyme®
Interferón alfa-N3, derivado de leucocitos humanos	Alferon N®
factor antihemofílico humano	Alphanate®
factor IX de coagulación humano filtrado de virus	AlphaNine® SD
Alefacept; proteína de fusión dimérica LFA3-Ig, recombinante	Amevive®
Bivalirudina	Angiomax®
darbepoetina alfa	Aranesp™
Bevacizumab	Avastin™
interferón beta-1a; recombinante	Avonex®
factor IX de coagulación	BeneFix™
interferón beta-1b	Betaseron®
Tositumomab	BEXXAR®
factor antihemofílico	Bioclate™
hormona del crecimiento humana	BioTropin™
toxina botulínica tipo A	BOTOX®
Alemtuzumab	Campath®
Acritumomab; marcado con tecnecio-99	CEA-Scan®
alglucerasa; forma modificada de beta-glucocerebrosidasa	Ceredase®
Imiglucerasa; forma recombinante de beta-glucocerebrosidasa	Cerezyme®
Fab inmune polivalente de crótalo, ovino	CroFab™
Fab inmune de digoxina [ovino]	DigiFab™
Rasburicasa	Elitek®
Etanercept	ENBREL®
epoyetina alfa	Epogen®
Cetuximab	Erbix™
algasidasa beta	Fabrazyme®
Urofollitropina	Fertinex™
follitropina beta	Follistim™
Teriparatida	FORTEO®

ES 2 389 618 T3

Producto proteico	Fármaco enumerado de referencia
somatropina humana	GenoTropin®
Glucagón	GlucaGen®
Follitropina alfa	Gonal-F®
factor antihemofílico	Helixate®
factor antihemofílico; Factor XIII	HEMOFIL
adefovir dipivoxilo	Hepsera™
Trastuzumab	Herceptin®
Insulina	Humalog®
Complejo humano del factor antihemofílico/factor de von Willebrand	Humate-P®
Somatotropina	Humatrope®
Adalimumab	HUMIRA™
insulina humana	Humulin®
hialuronidasa humana recombinante	Hylenex™
interferón alfacon-1	Infergen®
eptifibatida	Integrilin™
alfa-interferón	Intron A®
Palifermina	Kepivance
Anakinra	Kineret™
factor antihemofílico	Kogenate®FS
Insulina glargina	Lantus®
factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Leukine®/Leukine® Líquido
lutropina alfa para inyección	Luveris
lipoproteína OspA	LYMErix™
Ranibizumab	LUCENTIS®
gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg™
Galsulfasa	Naglazyme™
Nesiritida	Natrecor®
Peg filgrastim	Neulasta™
Oprelvekin	Neumega®
Filgrastim	Neupogen®
Fanolesomab	NeuroSpec™ (previamente LeuTech®)
somatropina [ADNr]	Norditropin®/Norditropin Nordiflex®
Mitoxantrona	Novantrone®
insulina; suspensión de cinc	Novolin L®

ES 2 389 618 T3

Producto proteico	Fármaco enumerado de referencia
insulina; suspensión de isofano	Novolin N®
insulina, normal;	Novolin R®
Insulina	Novolin®
factor VIIa de coagulación	NovoSeven®
Somatropina	Nutropin®
immunoglobulina intravenosa	Octagam®
PEG-L-asparaginasa	Oncaspar®
abatacept, proteína de fusión soluble completamente humana	Orencia™
muromomab-CD3	Orthoclone OKT3®
hialuronano de peso molecular elevado	Orthovisc®
gonadotropina coriónica humana	Ovidrel®
<i>Bacilo de Calmette-Guerin</i> atenuado vivo	Pacis®
peginterferón alfa-2a	Pegasys®
versión pegilada de interferón alfa-2b	PEG-Intron™
Abarelix (suspensión inyectable); antagonista de hormona liberadora de gonadotropina	Plenaxis™
Epoyetina alfa	Procrit®
Aldesleucina	Proleukin, IL-2®
Somatrem	Protropin®
dornasa alfa	Pulmozyme®
Efalizumab; bloqueador de células T reversible, selectivo	RAPTIVA™
Combinación de ribavirina y alfa interferón	Rebetron™
Interferón beta 1a	Rebif®
factor antihemofílico	Recombinate® rAHF/
factor antihemofílico	ReFacto®
Lepirudina	Refludan®
Infliximab	REMICADE®
Abciximab	ReoPro™
Reteplesa	Retavase™
Rituxima	Rituxan™
Interferón alfa-2a	Roferon-A®
Somatropina	Saizen®
secretina porcina sintética	SecreFlo™
Basiliximab	Simulect®
Eculizumab	SOLIRIS (R)

Producto proteico	Fármaco enumerado de referencia
Pegvisomant	SOMAVERT®
Palivizumab; mAb humanizado, producido recombinantemente	Synagis™
tirotropina alfa	Thyrogen®
Tenecteplasa	TNKase™
Natalizumab	TYSABRI®
Disoluciones intravenosas al 5% y 10% de inmunoglobulina humana	Venoglobulin-S®
interferón alfa-n1, linfoblastoide	Wellferon®
drotrecogina alfa	Xigris™
Omalizumab; anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante dirigido con inmunoglobulina-E	Xolair®
Daclizumab	Zenapax®
ibritumomab tiuxetano	Zevalin™
Somatotropina	Zorbtive™ (Serostim®)

5

Los métodos descritos aquí pueden incluir producir un producto de glucoproteína diana que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el producto de glucoproteína primaria. En otros casos, la secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína diana puede diferir, por ejemplo, en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 20 aminoácidos, de los restos de aminoácidos primarios. Las secuencias de aminoácidos de los productos de glucoproteína primaria listados anteriormente son conocidas.

Métodos para determinar las propiedades y características de glucano:

10

En algunos casos, los métodos incluyen seleccionar un parámetro o parámetros de producción para producir una propiedad o propiedades de glucano preseleccionadas. La propiedad de glucano puede ser una propiedad funcional o una característica de glucano.

15

Se conocen los métodos para determinar características de glucano. Por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de una unidad química, o la presencia, ausencia o cantidad de un componente de una unidad química, se puede determinar como se describe mediante Geyer y Geyer (2006) *Biochim Biophys. Acta* 1764(12): 1853-1869, o mediante LC, MS, LC/MS, RMN, tratamiento con exoglucosidasa, GC, o combinaciones de estos métodos. La heterogeneidad o microheterogeneidad en un sitio de glucosilación potencial o a lo largo de toda la proteína se puede determinar, por ejemplo, usando los métodos descritos por Larsen et al. (2005) *Mol. Cell. Proteomics* (2005) 4(2): 107-119 o Forno et al. (2004) *Eur. J. Biochem.* (2004) 271(5): 907-919, o LC, MS, LC/MS, GC, PAGE, tratamiento enzimático, o combinaciones de estos métodos.

20

En algunos casos, la estructura central de un glucano ramificado o no ramificado se determina, por ejemplo, como se describe mediante Geyer y Geyer (2006) más arriba, LC, MS, LC/MS, tinción con lectina, GC, PAGE, escisión o adición enzimática, ELISA, RMN, análisis de monosacáridos, o combinaciones de estos métodos sobre la glucoproteína intacta, glucopéptidos, o glucano liberado. Los métodos ejemplares que se pueden usar para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una estructura de glucano y la posición relativa de una unidad química en un glucano se describen mediante Geyer y Geyer (2006) más arriba, o pueden incluir LC, MS, LC/MS, tinción con lectina, métodos cromatográficos, escisión enzimática, cuantificación mediante ELISA, análisis de monosacáridos, RMN, o combinaciones de métodos allí, sobre la glucoproteína, glucopéptidos, o glucano liberado.

25

La relación entre las unidades químicas (por ejemplo, enlaces entre unidades químicas, isómeros y puntos de ramificación) se puede determinar, por ejemplo, como se describe por Geyer y Geyer en *Biochim Biophys. Acta* (2006) más arriba, o mediante LC, MS, LC/MS, tinción con lectina, análisis de monosacáridos, métodos cromatográficos, tratamiento con exoglucosidasa, RMN, o combinaciones de métodos allí, sobre la glucoproteína, glucopéptidos o glucano liberado.

30

En algunos casos, la información sobre una estructura o estructuras de glucano, por ejemplo obtenida mediante un método descrito aquí, se puede integrar para describir las características de glucano de un producto de glucoproteína complejo. Por ejemplo, la información obtenida, por ejemplo mediante diversos métodos descritos

aquí, se puede usar de una manera de etapa por etapa para reducir las posibilidades iniciales de características de glucano en un producto de glucano primario y/o un producto de glucano diana. En un caso, los datos obtenidos con respecto a diversas características de glucano se pueden integrar usando los métodos descritos en la Publicación de Patente U.S. nº 20050065738.

5 Parámetros de producción:

Los métodos descritos aquí incluyen determinar y/o seleccionar un parámetro o parámetros de producción para una preparación de glucoproteína, de manera que se puede obtener una propiedad o propiedades de glucano preseleccionadas con la producción de una preparación de glucoproteína. Usando la información con respecto a los efectos de diversos parámetros de producción sobre la glucosilación, se pueden seleccionar parámetros de producción antes de la producción de una preparación de glucoproteína que se correlaciona positivamente con las propiedades de glucano deseadas. Un parámetro de producción, como se usa aquí, es un parámetro o elemento en un procedimiento de producción. Los parámetros de producción que se pueden seleccionar incluyen, por ejemplo, la célula o estirpe celular usada para producir la preparación de glucoproteína, el medio de cultivo, las variables del proceso de cultivo o del biorreactor (por ejemplo, discontinuo, discontinuo alimentado, o perfusión), procedimiento de purificación y formulación de una preparación de glucoproteína.

Los parámetros de producción primarios incluyen: 1) los tipos de hospedante; 2) la genética del hospedante; 3) tipo de medios; 4) plataforma de fermentación; 5) etapas de purificación; y 6) formulación. El parámetro de producción secundario, como se usa aquí, es un parámetro de producción que es ajustable o variable dentro de cada uno de los parámetros de producción primarios. Los ejemplos incluyen: selección de subclones del hospedante basándose en propiedades de glucano deseadas; regulación de niveles génicos del hospedante constitutivos o inducibles; introducción de nuevos genes o elementos promotores; aditivos de los medios (por ejemplo lista parcial en la Tabla IV); propiedades de crecimiento fisicoquímicas (por ejemplo lista parcial en la Tabla V); tipo de vasija de crecimiento (por ejemplo tipo de biorreactor, matraz T); densidad celular; ciclo celular; enriquecimiento de producto con un tipo deseado de glucano (por ejemplo mediante enriquecimiento mediado por anticuerpos o lectina, cromatografía de intercambio iónico, CE, o método similar); o parámetros de producción secundarios similares claros para alguien experto en la técnica.

Células y estirpes celulares

Los métodos descritos aquí pueden incluir determinar una célula o estirpe celular para proporcionar una propiedad de glucano que es la misma o sustancialmente la misma que una propiedad de glucano de una preparación de glucoproteína primaria, o que difiere de una propiedad de glucano de un producto de glucoproteína primaria. La célula seleccionada puede ser eucariota o procariota, en tanto que la célula proporcione o tenga añadido a ella las enzimas para activar y unir sacáridos presentes en la célula, o sacáridos presentes en el medio de cultivo celular o alimentados a las células. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células de levadura, de insectos, de hongos, células vegetales y de animales, especialmente células de mamíferos. Las células de mamífero adecuadas incluyen cualquier célula mortal normal o inmortal normal o anormal de animal o humana, incluyendo: la estirpe CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la estirpe de riñón embrionario humano (293) (Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); ovario de hámster chino (CHO), por ejemplo, DG44, DUKX-V11, GS-CHO (ATCC CCL 61, CRL 9096, CRL 1793 y CRL 9618); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243 251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 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 hepáticas de rata búfalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de melanoma de ratón (NSO); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI (Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44 46 (1982)); células de riñón canino (MDCK) (ATCC CCL 34 y CRL 6253), HEK 293 (ATCC CRL 1573), células WI-38 (ATCC CCL 75) (ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Md.), células MCF-7, células MDA-MB-438, células U87, células A127, células HL60, células A549, células SP10, células SHSY5Y, células Jurkat, células BCP-1, células GH3, células 9L, células MC3T3, células C3H-10T1/2, células NIH-3T3 y células C6/36. El uso de cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se explica generalmente en Winnacker, FROM GENES TO CLONES (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987).

Las células vegetales ejemplares incluyen, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, colza, maíz, trigo, arroz, tabaco, etc.) (Staub, et al. 2000 Nature Biotechnology 1(3): 333-338 y McGarvey, P. B., et al. 1995 Bio-Technology 13(13): 1484-1487; Bardor, M., et al. 1999 Trends in Plant Science 4(9): 376-380). Las células de insecto ejemplares (por ejemplo, *Spodoptera frugiperda* Sf9, Sf21, *Trichoplusia ni*, etc. Las células de bacteria ejemplar incluyen *Escherichia coli*. También se pueden seleccionar diversas levaduras y hongos, tales como *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Hansenula polymorpha*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

Una célula se puede seleccionar para la producción de una glucoproteína basado, por ejemplo, en atributos de la propia célula que produce o muestra una preferencia por la producción de la característica o características de glucano deseadas. Los atributos de la célula que pueden afectar a la glucosilación incluyen el tipo de célula, estado celular, el ciclo celular, el número de pasadas, y el nivel de estrés metabólico de la célula.

En otros casos, una glucoproteína se puede producir en una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería, por ejemplo un sistema de expresión de célula animal, de levadura, de hongos, de plantas, o de otra célula eucariota, manipulada genéticamente mediante ingeniería. Por ejemplo, una célula puede ser una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería, que expresa o sobreexpresa un componente, por ejemplo una proteína y/o azúcar o precursor de azúcar, que produce una característica o características deseadas de glucano. Una célula puede ser también manipulada genéticamente mediante ingeniería de manera que se aumente la actividad de un componente, por ejemplo una proteína y/o azúcar o precursor de azúcar, que produce una característica o características de glucano deseadas. La célula también se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para disminuir o reducir la producción de diversas unidades químicas, componentes de unidades químicas o estructuras de glucano. Por ejemplo, la célula se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para producir un antagonista de ácido nucleico tal como antisentido o ARNi que da como resultado una expresión reducida del componente implicado en la síntesis de una característica de glucano particular, por ejemplo una enzima y/o azúcar o precursor de azúcar implicado en la producción de una característica o características de glucano. La célula también se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para desactivar uno o más componentes, por ejemplo una enzima y/o azúcar o precursor de azúcar, implicado en la síntesis de una característica de glucano particular, o para producir un mutante menos activo o inactivo de un componente, por ejemplo una enzima y/o azúcar o precursor de azúcar, implicado en la síntesis de una característica o características de glucano particulares. El número de copias, el sitio de integración y las variables de transcripción pueden afectar a las características de glucano de una glucoproteína producida por la célula.

Los componentes de una célula que dan como resultado una característica o características deseadas de glucano pueden incluir enzimas implicadas en la adición o eliminación de una unidad química, un componente de una unidad química, o la producción de una estructura de glucano deseada. En algunos casos, la célula se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para expresar, sobreexpresar o incrementar de otro modo la actividad de una o más enzimas implicadas en la glucosilación. Otros casos incluyen una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería para reducir, eliminar o alterar de otro modo la actividad de una o más enzimas implicadas en la glucosilación. Las enzimas ejemplares incluyen enzimas que rompen polisacáridos, tales como enzimas degradantes, enzimas que añaden monosacáridos a una estructura de glucano, enzimas que eliminan un componente de un monosacárido, enzimas que añaden un componente a un monosacárido, y enzimas que convierten una unidad química en una unidad química diferente, por ejemplo convierten galactosa en una glucosa, etc.

Los ejemplos de enzimas degradantes incluyen una galactosidasa (por ejemplo, alfa-galactosidasa y beta-galactosidasa), una sialidasa (por ejemplo, una alfa 2→3 sialidasa y una alfa 2→6 sialidasa), una fucosidasa (por ejemplo, una alfa 1→2 fucosidasa, una alfa 1→3 fucosidasa, una alfa 1→4 fucosidasa y una alfa 1→6 fucosidasa). La beta-N-acetilhexosaminidasa de Jack Bean escinde N-acetilglucosamina terminal no reductora enlazada beta 1→2,3,4,6, y N-acetilgalactosamina de oligosacáridos, mientras que alfa-N-acetilgalactosaminidasa (hígado de pollo) escinde N-acetilgalactosamina terminal enlazada alfa 1→3 de glucoproteínas. Otras enzimas tales como aspartil N-acetilglucosaminidasa, escinden en un enlace beta después de una GlcNAc en la secuencia central de oligosacáridos enlazados mediante N.

Los ejemplos de enzimas que añaden un monosacárido a una estructura de glucano incluyen glucosiltransferasas, tales como una sialiltransferasa (por ejemplo, alfa 2→3 sialiltransferasa o alfa 2→6 sialiltransferasa), una fucosiltransferasa (por ejemplo, alfa 1→2 fucosiltransferasa, alfa 1→3 fucosiltransferasa, alfa 1→4 fucosiltransferasa o alfa 1→6 fucosiltransferasa), una galactosiltransferasa (por ejemplo, alfa 1→3 galactosiltransferasa, beta 1→4 galactosiltransferasa o beta 1→3 galactosiltransferasa), una N-acetilglucosaminiltransferasa (por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa I, II o III), y una manosiltransferasa.

Los ejemplos de enzimas que añaden, transfieren o eliminan un componente de un monosacárido incluyen: glucosamina N-acetil transferasa, N-acetilneuraminato 7-0 (o 9-0) acetil transferasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, N-acetilneuraminato 9-fosfato fosfatasa, N-acetilglucosamina desacetilasa, L-fucosa cinasa, galactocinasa 1, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, glucocinasa 1, GDP-manosa 4,6 deshidratasa, GDP manosa pirofosforilasa, N-acetilglucosamina sulfotransferasa, galactosil sulfotransferasa, glucosamina-fosfato N-acetil transferasa, hexocinasa, N-acetilglucosamina cinasa, fosfoglucomutasa, ácido N-acetilneuramínico fosfato sintetasa, UDP-N-GlcNAc-pirofosforilasa, UDP-glucuronato deshidrogenasa, y UDP-glucosa pirofosforilasa.

Otras enzimas ejemplares que se pueden afectar en una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería incluyen N-acetilglucosamina-6-fosfato 2-epimerasa, CMP-Neu5Ac hidroxilasa, CMP-Neu5Ac sintetasa, ácido siálico cíclico hidrolasa, fucosa-1-fosfato guaniltransferasa, UDP-galactosa-4-epimerasa, galactosa mutarratasa, manosiltransferasa, UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa, glucosa fosfato isomerasa, GDP-manosil transferasa, manosa fosfato isomerasa, N-acetilneuraminato piruvato liasa, ácido siálico ciclasa, UDP-glucuronato descarboxilasa, transportador de CMP-ácido siálico, transportador de GDP-fucosilo y transportador de UDP galactosilo.

Se conocen las secuencias que codifican tales enzimas.

Una célula seleccionada para la producción de una glucoproteína puede ser una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería que tiene reducida la expresión y/o actividad de una o más proteínas indicadas en la glucosilación. Por ejemplo, la célula se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para desactivar una o más proteínas implicadas en la síntesis de una característica de glucano particular, o para producir un mutante menos activo o inactivo de una proteína. Una célula también se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para producir un antagonista de ácido nucleico para disminuir la expresión de una o más proteínas implicadas en la síntesis de una característica de glucano particular.

Células desactivadas manipuladas genéticamente mediante ingeniería

En algunos casos, se puede seleccionar una célula que se ha manipulado genéticamente mediante ingeniería para la inactivación permanente o regulada de un gen que codifica una proteína implicada en la síntesis de un glucano particular. Por ejemplo, se pueden inactivar genes que codifican una enzima, tal como las enzimas descritas aquí. La inactivación permanente o regulada de la expresión génica se puede lograr dirigiendo un constructo de ADN plasmídico transfectado o un oligonucleótido sintético a un locus génico. El constructo plasmídico u oligonucleótido se puede diseñar de varias formas. Estas incluyen las siguientes: 1) la inserción de genes marcadores seleccionables u otras secuencias en un exón del gen que se inactiva; 2) la inserción de secuencias exógenas en regiones reguladoras de la secuencia no codificante; 3) la supresión o sustitución de secuencias reguladoras y/o codificantes; y 4) la alteración de una secuencia codificante proteica mediante mutagénesis específica del sitio.

En el caso de la inserción de un gen marcador seleccionable en la secuencia codificante, es posible crear una fusión en el marco de un exón endógeno del gen con el exón manipulado mediante ingeniería para que contenga, por ejemplo, un gen marcador seleccionable. De esta manera, tras la selección exitosa de la diana, el gen exógeno expresa un ARNm de fusión (secuencia de ácido nucleico más secuencia de marcador seleccionable). Además, el ARNm de fusión sería incapaz de producir un producto de traducción funcional.

En el caso de la inserción de secuencias de ADN en regiones reguladoras, la transcripción de un gen se puede silenciar interrumpiendo la región promotora endógena o cualquier otra región en la región no traducida 5' (5' UTR) que es necesaria para la transcripción. Tales regiones incluyen, por ejemplo, regiones de control traduccionales y donantes de ajuste de intrones. En segundo lugar, se puede insertar una nueva secuencia reguladora en dirección del gen, que haría al gen susceptible al control de factores extracelulares. De este modo, sería posible reducir o extinguir la expresión génica según se desee para la producción de glucoproteína. Además, se puede usar una secuencia que incluye un marcador seleccionable y un promotor para interrumpir la expresión de la secuencia endógena. Finalmente, todo o parte del gen endógeno se podría suprimir mediante diseño apropiado de sustratos seleccionadores de dianas.

Antagonistas de ácido nucleico

En ciertas implementaciones, se usan antagonistas de ácido nucleico para disminuir la expresión de una proteína diana, por ejemplo una proteína implicada en la síntesis de una característica de glucano, por ejemplo una enzima tal como las explicadas anteriormente. En un caso, el antagonista de ácido nucleico es un ARNpi que selecciona como diana ARNm que codifica la proteína diana. También se pueden usar otros tipos de ácidos nucleicos antagónicos, por ejemplo un aptámero de ácido nucleico, un ARNbc, una ribozima, un formador de triple hélice, o un ácido nucleico antisentido.

Los ARNpi son ARN bicatenarios (ARNbc) que incluyen opcionalmente salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNpi tiene alrededor de 18 a 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo alrededor de 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos de longitud. Típicamente, las secuencias de ARNpi son exactamente complementarias al ARNm diana. Los ARNbc y los ARNpi en particular se pueden usar para silenciar la expresión génica en células de mamíferos (por ejemplo, células humanas). Véanse, por ejemplo, Clemens, J. C. et al. (2000) Proc. Natl. Sci. USA 97, 6499-6503; Billy, E. et al. (2001) Proc. Natl. Sci. USA 98, 14428-14433; Elbashir et al. (2001) Nature. 411(6836):494-8; Yang, D. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9942-9947, US 2003-0166282, 2003-0143204, 2004-0038278, y 2003-0224432.

Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, desde alrededor de 8 hasta alrededor de 80 nucleobases (es decir, desde alrededor de 8 hasta alrededor de 80 nucleótidos), por ejemplo alrededor de 8 a alrededor de 50 nucleobases, o alrededor de 12 a alrededor de 30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos (oligozimas) de secuencia de guía externa (EGS), y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan al ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos antisentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser hibridable de forma específica. Un oligonucleótido es hibridable de forma específica cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para provocar una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a las secuencias no diana bajo condiciones en las que se desea la unión específica.

La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones de ARNm a interferir incluyen todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción proteica, traducción de proteína a partir del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que se puede acoplar mediante el ARN. La unión de proteína o proteínas específicas al ARN también se puede interferir mediante la hibridación de oligonucleótidos antisentido al ARN.

Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que se hibridan específicamente al ácido nucleico diana. La región complementaria se puede extender entre alrededor de 8 y alrededor de 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden incluir, por ejemplo, pirimidinas 5-sustituidas, tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina, y pirimidinas C5-propinílicas, tales como C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen N4-alquil(C1-C12)aminocitosinas y N4,N4-dialquil(C1-C12)aminocitosinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 7-sustituido-8-aza-7-desazapurinas y 7-sustituido-7-desazapurinas, tales como, por ejemplo, 7-yodo-7-desazapurinas, 7-ciano-7-desazapurinas, 7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Los ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-yodo-7-desazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-desazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-desazapurinas, y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Además, las N6-alquil(C1-C12) aminopurinas y N6,N6-dialquil(C1-C12)aminopurinas, incluyendo N6-metilaminoadenina y N6,N6-dimetilaminoadenina, también son nucleobases modificadas adecuadas. De forma similar, otras purinas 6-sustituidas, incluyendo por ejemplo 6-tioguanina, pueden constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina, y 2-fluoroguanina. También son apropiados los derivados de cualquiera de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente. Los sustituyentes de cualesquiera de los compuestos anteriores pueden incluir alquilo de C1-C30, alquenilo de C2-C30, alquinilo de C2-C30, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tío, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcocarbonilo, y similares.

También existen descripciones de otros tipos de agentes de ácido nucleico. Véanse, por ejemplo, los documentos US 4.987.071; US 5.116.742; US 5.093.246; Woolf et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA; Antisense RNA and DNA, D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-59; Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84; Helene (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) Bioassays 14:807-15.

Células genéticamente manipuladas mediante ingeniería para que expresen un componente implicado en la síntesis de glucano

Cuando las células se van a modificar genéticamente con el fin de expresar o sobreexpresar un componente, las células se pueden modificar mediante métodos convencionales de ingeniería genética, o mediante activación génica.

Según métodos convencionales, una molécula de ADN que contiene una secuencia de ADNc o de ADN genómico que codifica la proteína deseada se puede introducir en un constructo de expresión y se puede transfectar en células primarias, secundarias, o inmortalizadas, mediante métodos estándar que incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por liposomas, por polibreno, o por DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, o microproyectiles dirigidos por velocidad (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 6.048.729).

Como alternativa, se puede usar un sistema que suministra la información genética mediante vector vírico. Los virus conocidos como útiles para la transferencia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de las paperas, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis, y virus de la vacuna, tal como el virus de la viruela del canario.

Como alternativa, las células se pueden modificar usando un enfoque de activación génica, por ejemplo como se describe en la patente U.S. nº 5.641.670; patente U.S. nº 5.733.761; patente U.S. nº 5.968.502; patente U.S. nº 6.200.778; patente U.S. nº 6.214.622; patente U.S. nº 6.063.630; patente U.S. nº 6.187.305; patente U.S. nº 6.270.989; y patente U.S. nº 6.242.218.

En consecuencia, la expresión "genéticamente manipulada mediante ingeniería", como se usa aquí en referencia a las células, pretende englobar células que expresan un producto génico particular tras la introducción de una molécula de ADN que codifica el producto génico y/o que incluye elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia codificante para el producto génico. La molécula de ADN se puede introducir mediante selección de diana génica o mediante recombinación homóloga, es decir, introducción de la molécula de ADN en un sitio genómico particular.

Se conocen métodos para transfectar células, y reactivos tales como promotores, marcadores, secuencias señal, que se pueden usar para la expresión recombinante.

En algunos casos, el promotor y/o el sistema de expresión se pueden seleccionar, por ejemplo, como un parámetro de producción secundario. Por ejemplo, el promotor se puede seleccionar, por ejemplo, basándose en la célula hospedante que se esté usando.

Medios de cultivo y procesamiento

5 Los métodos descritos aquí pueden incluir determinar y/o seleccionar componentes de los medios o condiciones de cultivo que dan como resultado la producción de una propiedad o propiedades de glucano deseadas. Los parámetros de cultivo que se pueden determinar incluyen componentes de los medios, pH, condiciones de alimentación, osmolaridad, niveles de dióxido de carbono, velocidad de agitación, temperatura, densidad celular, densidad de siembra, tiempo y velocidad de aspersión.

10 Los cambios en los parámetros de producción, tales como la velocidad de agitación de un cultivo celular, la temperatura a la que se cultivan las células, los componentes en el medio de cultivo, los tiempos a los que se comienzan y se detienen los cultivos, la variación en el tiempo del suministro de nutrientes, pueden dar como resultado variación de las propiedades de glucano del producto de glucoproteína producido. De este modo, los métodos descritos aquí pueden incluir uno o más de: aumentar o disminuir la velocidad a la que se agitan las células, aumentar o disminuir la temperatura a la que se cultivan las células, añadir o retirar componentes de los medios, y alterar los tiempos a los que se comienzan y/o se detienen los cultivos.

15 Seleccionar secuencialmente un parámetro de producción o una combinación de los mismos, como se usa aquí, significa que se selecciona un primer parámetro (o combinación), y después se selecciona un segundo parámetro (o combinación), por ejemplo, basado en una restricción impuesta por la elección del primer parámetro de producción.

Medios

20 Los métodos descritos aquí pueden incluir determinar y/o seleccionar un componente de los medios y/o la concentración de un componente de los medios que tenga una correlación positiva con una propiedad o propiedades deseadas de glucano. Un componente de los medios se puede añadir en o se puede administrar a lo largo del transcurso de la producción de glucoproteína o cuando hay un cambio en los medios, dependiendo de las condiciones de cultivo. Los componentes de los medios incluyen componentes añadidos directamente al cultivo, así como también componentes que son un subproducto del cultivo celular.

25 Los componentes de los medios incluyen, por ejemplo, tampón, contenido de aminoácidos, contenido de vitaminas, contenido de sales, contenido de minerales, contenido sérico, contenido de fuente de carbono, contenido lipídico, contenido de ácido nucleico, contenido hormonal, contenido de oligoelementos, contenido de amoníaco, contenido de cofactores, contenido de indicadores, contenido de pequeñas moléculas, contenido de hidrolizados y contenido de moduladores enzimáticos.

La Tabla IV proporciona ejemplos de diversos componentes de los medios que se pueden seleccionar.

Tabla IV	
Aminoácidos	Precusores de azúcares
Vitaminas	Indicadores
Fuente de carbono (natural y no natural)	Nucleósidos o nucleótidos
Sales	Butirato u orgánicos
Azúcares	DMSO
Sueros	Productos derivados de animales
Hidrolizados derivados de plantas	Inductores de genes
Piruvato de sodio	Azúcares no naturales
Tensioactivos	Reguladores del pH intracelular
Amoníaco	Betaína u osmoprotectores
Lípidos	Oligoelementos
Hormonas o factores de crecimiento	Minerales
Tampones	Aminoácidos no naturales
Aminoácidos no naturales	Vitaminas no naturales

30

Los tampones ejemplares incluyen Tris, tricina, HEPES, MOPS, PIPES, TAPS, bicina, BES, TES, cacodilato, MES, acetato, MKP, ADA, ACES, glicinamida y acetamidoglicina.

5 Los medios pueden estar libres de suero, o pueden incluir productos derivados de animales, tales como, por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), suero fetal de ternera (FCS), suero de caballo (HS), suero humano, sustitutos de suero derivados de animales (por ejemplo, Ultrosor G, SF y HY; leche seca desnatada; Bovine EX-CYTE), fetuina, seroalbúmina bovina (BSA), albúmina sérica, y transferrina. Cuando se seleccionan medios libres de suero, se pueden incluir lípidos tales como, por ejemplo, ácido palmítico y/o ácido esteárico.

Los componentes lipídicos incluyen aceites, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, glicéridos, esteroides, fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas.

10 El aminoácido ejemplar que se puede incluir o eliminar de los medios incluye alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, prolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

15 Los ejemplos de vitaminas que pueden estar presentes en los medios o que se pueden eliminar de los medios incluyen vitamina A (retinoide), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina), vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B12 (cianocobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D, vitamina E, y vitamina K.

20 Los minerales que pueden estar presentes en los medios o se pueden eliminar de los medios incluyen bismuto, boro, calcio, cloro, cromo, cobalto, cobre, flúor, yodo, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, fósforo, potasio, rubidio, selenio, silicio, sodio, estroncio, azufre, telurio, titanio, volframio, vanadio y cinc. Las sales y minerales ejemplares incluyen CaCl_2 (anhidro), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, KCl, KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 (anhidro), NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , Na_2SE_3 (anhidro), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; ácido linoleico, ácido lipoico, D-glucosa, hipoxantina 2Na, rojo fenol, putrescina 2HCl, piruvato sódico, timidina, ácido pirúvico, succinato sódico, ácido succínico, ácido succínico-Na-hexahidratado, glutatión (reducida), ácido para-aminobenzoico (PABA), linoleato de metilo, bacto peptona G, adenosina, citidina, guanosina, 2'-desoxiadenosina HCl, 2'-desoxicitidina HCl, 2'-desoxiguanosina y uridina. Cuando la característica de glucano deseada es fucosilación reducida, los parámetros de producción pueden incluir cultivar una célula, por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr, en presencia de manganeso, por ejemplo manganeso presente en una concentración de alrededor de 0,1 μM a 50 μM . La fucosilación reducida también se puede obtener, por ejemplo, cultivando una célula (por ejemplo, una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) a una osmolalidad de alrededor de 350 a 500 mOsm. La osmolalidad se puede ajustar añadiendo sal a los medios, o haciendo que se produzca sal como un subproducto a medida que se produce la evaporación durante la producción.

35 Las hormonas incluyen, por ejemplo, somatostatina, factor liberador de hormona del crecimiento (GRF), insulina, prolactina, hormona del crecimiento humana (hGH), somatotropina, estradiol, y progesterona. Los factores de crecimiento incluyen, por ejemplo, proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento derivado de huesos (BDGF), factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-beta1), [factores de crecimiento del documento US 6.838.284 B2], hemina y NAD.

Los ejemplos de tensioactivos que pueden estar presentes o se pueden eliminar de los medios incluyen Tween-80 y Pluronic F-68.

40 Las moléculas pequeñas pueden incluir, por ejemplo, butirato, amoníaco, azúcares no naturales, aminoácidos no naturales, cloroquina, y betaina.

45 En algunos casos, el contenido de amoníaco se puede seleccionar como un parámetro de producción para producir una característica o características de glucano deseadas. Por ejemplo, el amoníaco puede estar presente en los medios en un intervalo de 0,001 a 50 mM. El amoníaco se puede añadir directamente al cultivo y/o se puede producir como un subproducto de glutamina o glucosamina. Cuando la característica de glucano deseada es una o más de un número incrementado de estructuras con contenido elevado de manosa, fucosilación disminuida y galactosilación disminuida, los parámetros de producción seleccionados pueden incluir cultivar una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) en presencia de amoníaco, por ejemplo amoníaco presente en una concentración de alrededor de 0,01 a 50 mM. Por ejemplo, si la característica deseada de glucano incluye galactosilación disminuida, los parámetros de producción seleccionados pueden incluir cultivar una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) en medios que contienen suero y en presencia de amoníaco, por ejemplo amoníaco presente en una concentración de alrededor de 0,01 a 50 mM.

55 Otro parámetro de producción es el contenido de butirato. La presencia de butirato en los medios de cultivo puede dar como resultado niveles incrementados de galactosa en la preparación de glucoproteína resultante. El butirato proporciona un contenido incrementado de ácido siálico en la preparación de glucoproteína resultante. Por lo tanto, cuando se desea galactosilación y/o sialilación incrementadas, la célula usada para producir la glucoproteína (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) se puede cultivar en presencia de butirato.

En algunos casos, el butirato puede estar presente en una concentración de alrededor de 0,001 a 10 mM, por ejemplo alrededor de 2 mM a 10 mM. Por ejemplo, si la característica de glucano deseada incluye sialilación incrementada, los parámetros de producción seleccionados pueden incluir cultivar una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) en medios que contienen suero y en presencia de butirato, por ejemplo butirato presente en una concentración de alrededor de 2,0 a 10 mM. Tales métodos pueden incluir además seleccionar una o más condiciones de cultivo adherente y cultivar en un matraz T.

En algunos casos, un componente, tal como una enzima, azúcar y/o precursores de azúcar, se puede añadir a los medios o se puede alimentar de forma discontinua a las células para efectuar la glucosíntesis. Por ejemplo, las enzimas y sustratos tales como precursores de azúcares se pueden añadir a los medios o se pueden alimentar de forma discontinua a las células para producir una característica o características de glucano deseadas. Estos métodos pueden hacer uso de sustratos de monosacárido que son absorbidos por una célula, convertidos en sustratos de monosacárido "activados" *in vivo*, e incorporados en la proteína expresada mediante la célula. Los métodos son susceptibles a cualquier célula que se pueda manipular para producir una glucoproteína deseada. La célula puede usar, por ejemplo, rutas de procesamiento bioquímico endógenas, o se puede manipular genéticamente mediante ingeniería para convertir o procesar el monosacárido añadido exógenamente en una forma activada que sirva como un sustrato para la conjugación *in vivo* o *in vitro* a una glucoproteína diana.

Los monosacáridos añadidos a una cadena de polisacárido se pueden incorporar en forma activada. Los monosacáridos activados, que se pueden añadir, incluyen UDP-galactosa, UDP-glucosa, UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, UDP-xilosa, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido N-acetilneuramínico y CMP-ácido N-acetilglicolilneuramínico. Otros precursores de monosacárido que se pueden añadir a los medios o se pueden alimentar de forma discontinua a las células incluyen: N-acetilglucosamina, glucosamina, glucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, fructosa, fucosa, glucosa-6-fosfato, manosa-6-fosfato, manosa-1-fosfato, fructosa-6-fosfato, glucosamina-6-fosfato, N-acetilglucosamina-6-fosfato, N-acetilmanosamina, ácido N-acetilneuramínico-6-fosfato, fucosa-1-fosfato, ATP, GTP, GDP, GMP, CTP, CDP, CMP, UTP, UDP, UMP, uridina, adenosina, guanosina, citosina, lactosa, maltosa, sacarosa, fructosa 1,6 bifosfato, 2 fosfoenol piruvato, 2-oxaloacetato y piruvato.

Las formas activadas de los monosacáridos se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la galactosa se puede activar a UDP-galactosa mediante varias vías, incluyendo: fosforilación directa en la posición 1 para dar Gal-1-P, que puede reaccionar con UTP para dar UDP-galactosa; Gal-1-P se puede convertir en UDP-galactosa vía la reacción de intercambio mediante uridil transferasa con UDP-galactosa, que desplaza Glc-1-P. UDP-glucosa puede derivar de glucosa convirtiendo la glucosa en Glc-6-P mediante hexocinasa, y después en Fru-6-P mediante fosfoglucoisomerasa, o en Glc-1-P mediante fosfoglucomutasa. La reacción de Glc-1-P con UTP forma UDP-glucosa. La GDP-fucosa puede derivar de GDP-Man mediante reducción con CH₂OH en la posición C-6 de manosa hasta un CH₃. Esto se puede realizar mediante la acción secuencial de dos enzimas. En primer lugar, la C-4 manosa de GDP-Man se oxida a una cetona, GDP-4-deshidro-6-desoxi-manosa, mediante GDP-Man 4,6-deshidratasa, junto con la reducción de NADP a NADPH. La GDP-4-ceto-6-desoximanosa es epimerizada en C-3 y C-5 para formar GDP-4-ceto-6-desoxiglucosa, y después es reducida con NADPH en C-4 para formar GDP-fucosa. Los métodos para obtener otras formas activadas de monosacárido se pueden encontrar, por ejemplo, en Varki, A et al., eds., *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1999).

Un monosacárido activado se puede incorporar en una cadena de polisacárido usando la glucosiltransferasa apropiada. Por ejemplo, para incorporar un ácido siálico, CMP-ácido siálico en una cadena de polisacárido, se puede usar una sialiltransferasa, por ejemplo alfa 2→3 sialiltransferasa o alfa 2→6 sialiltransferasa). Para incorporar una fucosa, se puede usar una fucosiltransferasa, por ejemplo alfa 1→2 fucosiltransferasa, alfa 1→3 fucosiltransferasa, alfa 1→4 fucosiltransferasa o alfa 1→6 fucosiltransferasa. Las glucosiltransferasas para incorporar galactosa y GlcNAc incluyen una galactosiltransferasa (por ejemplo, alfa 1→3 galactosiltransferasa, beta 1→4 galactosiltransferasa o beta 1→3 galactosiltransferasa, y una N-acetilglucosaminiltransferasa (por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa I, II o III), respectivamente. Se conocen las glucosiltransferasas para incorporar otros monosacáridos. La glucosiltransferasa se puede añadir a los medios o se puede alimentar de forma discontinua a la célula, o la célula puede usar rutas de procesamiento endógenas o se puede manipular mediante ingeniería genética para convertir o procesar el monosacárido añadido exógenamente.

Se describen aquí otros ejemplos de enzimas que se pueden añadir a los medios o se pueden alimentar de forma discontinua a la célula.

Algunos aspectos incluyen tener glucosamina presente en los medios. La glucosamina se puede añadir a los medios o se puede alimentar de forma discontinua a la célula, o las enzimas y/o sustratos apropiados se pueden añadir a los medios o se pueden alimentar de forma discontinua a las células, de manera que se produzca la glucosamina. Por ejemplo, uno o más de N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina 6-fosfato, N-acetilmanosamina o fructosa se puede añadir a los medios o se puede alimentar de forma discontinua a la célula para la producción de glucosamina. Las células cultivadas en presencia de glucosamina pueden proporcionar niveles reducidos de fucosilación y/o galactosilación. De este modo, en algunos casos, cuando se desea una fucosilación y/o galactosilación reducida, se puede cultivar una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr), por ejemplo en medios que contienen suero, en presencia de glucosamina. La presencia de glucosamina en el cultivo celular puede incrementar también la cantidad de estructuras con alto contenido de manosa y de estructuras híbridas en

una preparación de glucoproteína. De este modo, en algunos casos, cuando se desean niveles incrementados de estructuras con alto contenido de manosa o estructuras de glucano híbridas, se puede cultivar una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) en presencia de glucosamina. La glucosamina puede estar presente en una concentración, por ejemplo, de alrededor de 0,001 a 40 mM.

5 Los métodos pueden incluir además añadir uridina a los medios o alimentarla de forma discontinua a una célula, por ejemplo para reducir el nivel de estructuras con alto contenido de manosa asociadas con una proteína producida por la célula. La adición de citidina, UTP, OMP y/o aspartato a los medios, o la alimentación de forma discontinua a las células, también puede dar lugar como resultado la producción de uridina durante el cultivo. Preferiblemente, la uridina está presente en una concentración de alrededor de 0,001 a 10 mM.

10 Otros aspectos incluyen seleccionar un componente o componentes de los medios que no afecten significativamente a una característica o características de glucosilación. Por ejemplo, la presencia de glucosamina y uridina en el cultivo no altera significativamente la galactosilación, fucosilación, producción elevada de manosa, producción híbrida o sialilación de glucoproteínas producidas por una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) cultivada en presencia de esta combinación. Además, la presencia de manosa en el cultivo no altera significativamente la galactosilación, fucosilación, producción elevada de manosa, producción híbrida o sialilación de glucoproteínas producidas mediante una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) cultivada en presencia de manosa. De este modo, los métodos descritos aquí pueden incluir seleccionar un componente de los medios tal como manosa y/o la combinación de glucosamina y uridina de manera que la característica o características de glucano no se ven alteradas significativamente por este componente (o componentes) de los medios.

20 Cuando la presencia de manosa es un parámetro de producción seleccionado, se puede añadir manosa a los medios, se puede alimentar de forma discontinua a las células, o se puede producir mediante una célula expuesta a los sustratos apropiados, tales como frutosa o manano. Preferiblemente, la manosa está presente en una concentración de alrededor de 0,001 a 50 mM.

25 En la Tabla II, a continuación, se describen diversos parámetros de producción, incluyendo componentes de los medios y condiciones de cultivo (Columna A) y el efecto sobre una característica de glucano (Fila A).

Tabla II:

A	Galactosilación	Fucosilación	Contenido elevado de manosa	Híbrido	Sialilación
Manosa					
Glucosamina	Disminuyó	Disminuyó	Aumentó	Aumentó	
ManNAc					
Butirato	Aumentó				
450 mOsm		Disminuyó			
Amoníaco	Disminuyó	Disminuyó	Aumentó		
32C					
15% de CO ₂		Disminuyó			
Manganeso		Disminuyó			
Glucosamina con uridina					
Uridina			Disminuyó		

Parámetros fisicoquímicos

30 Los métodos descritos aquí pueden incluir seleccionar condiciones de cultivo que se correlacionan con una propiedad o propiedades de glucano deseadas. Tales condiciones pueden incluir temperatura, pH, osmolalidad, fuerza de cizallamiento o velocidad de agitación, oxidación, velocidad de rociado, vasija de crecimiento, flujo tangencial, densidad óptica (DO), CO₂, nitrógeno, discontinuo alimentado, redox, densidad celular y estrategia de alimentación. En la Tabla V se proporcionan ejemplos de parámetros fisicoquímicos que se pueden seleccionar.

Tabla V:	
Temperatura	DO
pH	CO ₂
osmolalidad	nitrógeno
fuerza de cizallamiento, o velocidad de agitación	alimentación discontinua alimentada
oxidación	redox
velocidad de rociado	densidad celular
vasija de crecimiento	cultivo de perfusión
flujo tangencial	estrategia de alimentación
lote	

5 Por ejemplo, el parámetro de producción puede ser cultivar una célula en condiciones de pH ácido, neutro o básico. Las temperaturas se pueden seleccionar de 10 a 42°C. Por ejemplo, una temperatura de alrededor de 28 a 36°C no altera significativamente la galactosilación, fucosilación, producción elevada de manosa, producción híbrida o sialilación de glucoproteínas producidas mediante una célula (por ejemplo una célula CHO, por ejemplo una célula CHO deficiente en dhfr) cultivada a estas temperaturas. Además, cualquier método que ralentice la velocidad de crecimiento de una célula también puede tener este efecto. De este modo, las temperaturas en este intervalo o los métodos que ralenticen la velocidad de crecimiento se pueden seleccionar cuando es deseable no tener este parámetro de producción que altera la glucosíntesis.

10 En otros casos, se pueden seleccionar los niveles de dióxido de carbono, que dan como resultado una característica o características de glucano deseadas. Los niveles de CO₂ pueden ser, por ejemplo, alrededor de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 13%, 15%, 17%, 20%, 23% y 25% (e intervalos entre ellos). En un caso, cuando se desea una fucosilación disminuida, la célula se puede cultivar a niveles de CO₂ de alrededor de 11 a 25%, por ejemplo alrededor de 15%. Los niveles de CO₂ se pueden ajustar manualmente, o pueden ser un subproducto celular.

15 Un amplio conjunto de matraces, botellas, reactores y controladores permiten la producción y el aumento de escala de los sistemas de cultivo celular. El sistema se puede escoger basándose, al menos en parte, en su correlación con una propiedad o propiedades de glucano deseadas.

Las células se pueden hacer crecer, por ejemplo, como cultivos discontinuos, discontinuos alimentados, de perfusión, o continuos.

20 Los parámetros de producción que se pueden seleccionar incluyen, por ejemplo, la adición o eliminación de medios, incluyendo cuándo (de forma temprana, a la mitad o tardíamente durante el tiempo de cultivo) y cuán a menudo se cosechan los medios; incrementar o disminuir la velocidad a la que se agitan los cultivos celulares; incrementar o disminuir la temperatura a la que se cultivan las células; añadir o eliminar medios, de manera que se ajusta la densidad del cultivo; seleccionar un tiempo en el que se inician o se detienen los cultivos celulares; y seleccionar un tiempo en el que se cambian los parámetros del cultivo celular. Tales parámetros se pueden seleccionar para cualesquiera condiciones de cultivo discontinuo, discontinuo alimentado, de perfusión y continuo, por ejemplo descritas más abajo.

30 Cultivo discontinuo: El cultivo discontinuo se lleva a cabo colocando las células a cultivar en un volumen fijo de medio de cultivo y permitiendo que las células crezcan. Los números de células aumentan, habitualmente de forma exponencial, hasta que se alcanza un máximo, después de lo cual se detiene el crecimiento y las células mueren. Esto puede ser debido al agotamiento de un nutriente o a la acumulación de un inhibidor del crecimiento. Para recuperar producto, las células se retiran del medio cuando las células han muerto, o en un punto previo, predeterminado. El cultivo discontinuo se caracteriza porque transcurre en un volumen fijo (puesto que no se añade nada después de colocar las células en el medio), durante un tiempo fijo (dependiente de la duración de tiempo que sobrevivan las células) con una única cosecha y muriendo las células o siendo descartadas al final del proceso.

35 Cultivo discontinuo alimentado: Éste es una variación del cultivo discontinuo, e implica la adición de una alimentación al lote. Las células se cultivan en un medio en un volumen fijo. Antes de que se alcance la concentración celular máxima, se añaden al cultivo nutrientes suplementarios específicos. El volumen de la alimentación es mínimo en comparación con el volumen del cultivo. Un cultivo discontinuo alimentado implica un cultivo celular discontinuo al que se añade sustrato, ya sea en forma sólida o líquida concentrada, ya sea periódica o continuamente durante el período de crecimiento. El cultivo discontinuo alimentado también se caracteriza porque transcurre habitualmente en un volumen sustancialmente fijo, durante un tiempo fijo, y con una única cosecha, ya

sea cuando las células han muerto o en un punto predeterminado, previo. Los cultivos discontinuos alimentados se describen, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.672.502.

5 Cultivo de perfusión: En un cultivo de perfusión, el medio se perfusiona a través del reactor a una velocidad elevada mientras que las células son retenidas o se reciclan nuevamente al reactor mediante sedimentación, centrifugación o filtración. Hasta diez volúmenes de reactor de medio se perfusionan a través del biorreactor en un día. La función principal de la perfusión de tal volumen grande de medio es principalmente eliminar los metabolitos, principalmente lactato, del fluido del cultivo. Los cultivos de perfusión se describen, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.544.788.

10 Cultivo continuo: En el cultivo continuo, las células se hacen crecer inicialmente en un volumen fijo de medio. Para evitar el comienzo de la fase de declinación, se inicia una alimentación bombeada de medio reciente antes de que se alcance la concentración celular máxima. El cultivo, que contiene una proporción de las células, se elimina de forma continua de la vasija para mantener un volumen constante. El proceso elimina un producto, que se puede cosechar continuamente, y proporciona un suministro continuo de nutrientes, que permite que las células sean mantenidas en un estado de crecimiento exponencial. El cultivo continuo se caracteriza por un aumento continuo en el volumen del cultivo, de producto, y el mantenimiento de un cultivo que crece exponencialmente. No hay o hay poca muerte o fase de declinación. En un cultivo continuo, a las células se les alimenta continuamente medio de nutriente reciente, mientras que el medio gastado, las células, y el producto celular excretado son eliminados. Los cultivos continuos y los biorreactores se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n°s 4.764.471; 5.135.853; 6.156.570.

Biorreactores

20 Un biorreactor es un dispositivo o sistema que soporta un entorno biológicamente activo, por ejemplo un dispositivo o sistema para hacer crecer células o tejidos en el contexto de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, vegetales, de levadura, bacterianas). Este procedimiento puede ser aerobio o anaerobio. Los biorreactores son habitualmente cilíndricos, oscilando en tamaño desde algunos litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable. Basándose en el modo de operación, un biorreactor se puede clasificar como discontinuo, discontinuo alimentado, o continuo (por ejemplo, un modelo de reactor de tanque agitado continuo).

30 Un biorreactor se puede usar para grandes volúmenes de cultivo (en el intervalo de 100-10.000 litros). Las estirpes celulares en suspensión se pueden mantener en suspensión, por ejemplo, mediante un propulsor en la base de la vasija de la cámara (por ejemplo, biorreactores de tanque agitado o de matraz agitado), o burbujear aire a través de la vasija de cultivo. Estos dos métodos de agitación pueden dar lugar a esfuerzos mecánicos. Para proteger a las células del cizallamiento y/o para obtener densidades celulares elevadas en biorreactores que son productivos durante períodos de semanas o meses, se pueden usar membranas, matrices porosas (por ejemplo, matrices cerámicas), y geles de polisacáridos.

35 Los biorreactores giratorios que usan la acción giratoria para mantener bien perfusionadas a las células, parecidos a botellas giratorias. A fin de crear un entorno de densidad elevada, la cámara de cultivo se puede separar de la cámara alimentadora mediante una membrana semipermeable. Esto permite que se cambien los medios sin perturbar las células. Usando este principio, la acción giratoria en el Synthecon's Rotary Cell Culture System (RCCS) crea un entorno de microgravedad, eliminando virtualmente las fuerzas de cizallamiento. Esto permite desviar recursos desde el control de daños para establecer relaciones con otras células, imitando las matrices tridimensionales (3-D) complejas encontradas in vivo. Las vasijas rectoras tienen tamaños que oscilan desde 10 ml hasta 500 ml.

Los ejemplos no limitantes de biorreactores son los siguientes.

45 El biorreactor Heraeus miniPERM combina un recipiente de nutrientes externo que se puede someter a autoclave y una cámara de biorreactor interna desechable. Se puede seleccionar la membrana de corte de peso molecular apropiada para un producto deseado (por ejemplo, un producto descrito aquí). Su pequeño tamaño le permite caber en incubadoras estándar. Son posibles densidades mayores de 10^7 células por ml, y rendimientos de producto de 160 mg en cuatro semanas.

50 New Brunswick Scientific's CELLIGEN PLUS® es un sistema muy flexible para el cultivo de virtualmente todas las estirpes de células eucariotas. Las características incluyen un impulsor de malla doble para la saturación incrementada de O_2 , el control interactivo de cuatro gases, rociador de anillo interno, cinco bombas programables, interfaz de ordenador para el control del sistema y el registro de datos, y resultado registrador de cuatro canales. La unidad se puede usar como un sistema de tanque agitado o de lecho fibroso.

55 El Wave Bioreactor™ (de Wave Biotech, LLC) emplea una plataforma basculante de velocidad ajustable y una bomba de aire eléctrica para airear suavemente el cultivo mientras que se mantienen bajas las fuerzas de cizallamiento. Los cultivos más pequeños y las plataformas basculantes cabrán en una incubadora estándar. El medio de cultivo y las células sólo están en contacto con una cámara desechable, previamente estéril, denominada Cellbag, que se coloca en una plataforma basculante especial. El movimiento basculante de esta plataforma induce ondas en el fluido de cultivo. Estas ondas proporcionan mezclamiento y transferencia de oxígeno, dando como resultado un entorno perfecto para el crecimiento celular, que puede soportar fácilmente alrededor de 20×10^6

células/ml. El biorreactor no requiere limpieza ni esterilización, proporcionando una facilidad última en operación y protección frente a la contaminación cruzada.

5 Quark Enterprises proporciona un intervalo completo de biorreactores, incluyendo sus matraces Spingro® para el cultivo de densidad elevada. Estos matraces de agitación de borosilicato oscilan desde 100 ml a 36 l, y presentan paletas giratorias de Teflon®, aberturas laterales para las sondas y la toma fácil de muestras, y modelos encamisados para uso con un baño de agua de recirculación. Todos los modelos se pueden someter completamente a autoclave.

El sistema ProCulture DynaLift (Corning) facilita la perfusión y reduce los efectos de cizallamiento usando una paleta extendida, pantallas laterales, y contornos inferiores. Está disponible en un intervalo de tamaños de 125 ml a 36 l.

10 Otro ejemplo es el biorreactor Braun Biotech's Biostat®.

15 Los cultivos más grandes de células se han logrado a menudo en sistemas de tipo fermentador. Las células en suspensión son más fáciles de aumentar de escala en este sistema. El crecimiento y cosechado celulares a menudo es directo una vez que se han delineado los parámetros para lograr el producto máximo. Los monitores en línea para pH, saturación gaseosa, y metabolitos, están disponibles de la mayoría de proveedores. Las células adherentes plantean un reto. Algunas se pueden "adaptar en suspensión". Para mejorar el cultivo, se pueden emplear como soporte perlas microportadoras (véase más abajo).

Biorreactores de tanque agitado:

Los tanques agitados (y matraces) pueden proporcionar cultivos celulares con densidad incrementada. Los ejemplos incluyen los siguientes.

20 Un biorreactor de tanque agitado desechable (Xcellerex): un biorreactor de tanque agitado desechable, escalable (XDR™), que puede operar como un sistema montado en patines por sí solo, o se integra en un FlexFactory™. El XDR incorpora sensores del proceso que monitorizan y controlan las condiciones del cultivo hasta una escala de volumen de trabajo de 1.000 l o 2.000 l. FlexFactory™ es un tren de producción modular, completo, de llave en mano, para productos bioterapéuticos y vacunas. Los componentes desechables, de un solo uso, que son centrales para el FlexFactory™, le dotan de una gran flexibilidad para adecuarse a nuevos cambios del proceso, incluyendo la producción de múltiples productos en un solo sitio, y para establecer rápidamente la capacidad de fabricación, a unos costes drásticamente menores que las instalaciones tradicionales de tanque fijo, con tuberías fijas.

30 Applikon ofrece una línea completa de tanques agitados, desde los sistemas de laboratorio de 2,3 l hasta las unidades de producción de 10.000 l. También existen para todas las unidades bombas, sondas, controladores y software. Los vasos de vidrio de borosilicato están disponibles hasta 20 l, y se pueden ajustar con agitadores acoplados magnéticamente o sellados por labios. Las vasijas de acero inoxidable BioClave™ se diseñan para la producción moderada a gran escala, y presentan una mirilla de nivel longitudinal montada rasante, así como una elección de agitadores de sello de labios o magnéticos.

Biorreactores de agitación con aireación:

35 Una alternativa al tanque agitado es el biorreactor de agitación con aireación. El reactor no tiene paletas móviles para crear fuerzas de cizallamiento, a las que algunas células de mamífero y de hibridoma son particularmente sensibles. Los medios perfusionan desde la parte superior, mientras que el oxígeno entra desde la parte inferior, creando un entorno de mezclamiento casi ideal.

40 Kimble-Kontes fabrica el biorreactor de vidrio agitado con aireación CYTOLIFT®, con un volumen eficaz de 580 ml. Se limpia fácilmente, y se puede someter completamente a autoclave para el comportamiento consistente y una vida prolongada. En todos los modelos es normal una camisa de vidrio. Otras características incluyen una válvula de comprobación para evitar el flujo hacia atrás en caso de caída de presión, puertos de salida, infusión y efluente, más tres puertos para el pH, nivel de espuma, y sondas de dO₂. CYTOSTIR® (también de Kimble-Kontes) es una línea de biorreactores de brazos laterales dobles en nueve tamaños, de 100 ml a 36 l. Las paletas grandes de agitación, ajustables en altura, están construidas de TEFLON®, para minimizar la adhesión celular y facilitar la limpieza. Los componentes se pueden someter a autoclave con vapor.

Biorreactores discontinuos:

50 En los biorreactores discontinuos, el medio y el inóculo se cargan al comienzo, y se deja crecer a las células. No hay ninguna adición/sustitución del medio, y toda la masa celular se cosecha al final del período de incubación. Los rasgos característicos de tales sistemas biorreactores son los siguientes: (i) agotamiento continuo del medio, (ii) acumulación de desechos celulares, (iii) alteraciones en la velocidad de crecimiento, y (iv) cambio continuo en la composición de las células.

Como biorreactor discontinuo se puede usar un biorreactor de filtro giratorio cerrando la entrada para el medio y las salidas para el medio/medio más células.

Los biorreactores discontinuos están disponibles, por ejemplo, de Rockland Immunochemicals, Inc.

Biorreactores discontinuos alimentados:

5 En los reactores discontinuos alimentados (semi-discontinuos), se añade alimentación, pero no se retira efluente (ni las células). De este modo, los reactores discontinuos alimentados se pueden usar para mantener a las células bajo condiciones de sustrato o de nutriente bajas sin que se produzca la eliminación por lavado. Debido a que las células no son eliminadas durante el cultivo, los biorreactores discontinuos alimentados son muy adecuados para la producción de compuestos producidos durante un crecimiento muy lento o nulo. A diferencia de un biorreactor continuo, la alimentación no necesita contener todos los nutrientes necesarios para sostener el crecimiento. La alimentación puede contener sólo una fuente de nitrógeno o un precursor metabólico.

10 Biorreactores continuos:

15 En biorreactores continuos, hay un flujo de entrada continuo de medio reciente y un flujo de salida de medio usado (con o sin células) durante todo el período de incubación. Las células se propagan continuamente así en el medio reciente que entra al reactor, y, al mismo tiempo, se eliminan en el efluente los productos, productos de desecho metabólicos y las células. Un ejemplo de biorreactor de flujo continuo es un biorreactor de filtro giratorio. Puede tener las siguientes características: (1) el eje central del biorreactor aloja un filtro giratorio que permite la eliminación del medio usado, libre de células, a través del eje; (2) una placa agitadora acoplada magnéticamente al eje central proporciona una agitación continua; el filtro agitador también agita al cultivo; (3) el cultivo se airea mediante un rociador, que permite un amplio intervalo de velocidades de aireación; (4) se proporciona un puerto para la adición de medio reciente, mientras que (5) otro puerto permite la eliminación del cultivo (medio usado + células) según se necesite.

20 El reactor proporciona un sistema muy versátil para el control de la velocidad de cambio del medio y de la densidad celular; esto se hace posible debido a las dos rutas para eliminar el medio, mientras que una de ellas permite eliminar las células.

25 Un biorreactor de flujo continuo se puede usar para hacer crecer células a una densidad celular específica en una fase de crecimiento activa; tales cultivos pueden proporcionar inóculos para el cultivo posterior, o pueden servir como una fuente continua de rendimientos de biomasa.

Biorreactores de células inmovilizadas:

30 Estos biorreactores se basan en células atrapadas en geles, tales como agarosa, agar, quitosano, gelatina, gelano, poli(acrilamida) y alginato de calcio, para producir perlas, o en un compartimiento o cilindro de membrana o malla metálica (acero inoxidable).

Como ejemplo de la operación de tal biorreactor: el cilindro de malla de membrana que contiene las células se mantiene en una cámara a través de la cual se hace circular el medio desde una cámara de recirculación. El medio fluye paralelo al cilindro de malla y se difunde a través de la malla en la masa celular.

35 De forma similar, los productos de las células se difunden al medio y fuera del cilindro de malla. El compartimiento de membrana/malla que aloja a las células puede ser cilíndrico o plano, y el movimiento del medio se puede ajustar para que fluya a través del compartimiento de malla en lugar de paralelo a él. Regularmente se añade medio reciente y se extrae de la cámara de reciclaje un volumen equivalente de medio usado para mantener su estado de nutrientes.

40 La inmovilización celular cambia la fisiología de las células en comparación con la de las células en suspensión. Esta técnica es útil cuando el producto bioquímico de interés es excretado por las células al medio.

La excreción del producto también se puede provocar por la propia inmovilización, o por ciertos tratamientos como pH alterado, uso de DMSO (dimetilsulfóxido) como agente permeabilizante, fuerza iónica cambiada del medio, un provocador, etc.

45 Los reactores de células inmovilizadas tienen las siguientes ventajas: (i) ningún riesgo de eliminación de células por lavado, (ii) riesgo bajo de contaminación, (iii) protección de las células del cizallamiento líquido, (iv) un mejor control del tamaño del agregado celular, (v) separación de la fase de crecimiento (en un biorreactor discontinuo/continuo) de la etapa de producción (en un biorreactor de células inmovilizadas), (vi) los desechos celulares se eliminan regularmente del sistema, y (vii) los cultivos tienen densidades celulares elevadas.

Biorreactores de múltiples etapas:

50 Tales sistemas de cultivo usan dos o más biorreactores en una secuencia específica, cada una de las cuales lleva a cabo una etapa específica del procedimiento de producción total. La situación más simple implicaría dos biorreactores. Por ejemplo, para la producción de un producto bioquímico, ambos biorreactores pueden ser de tipo discontinuo: el primer biorreactor proporciona condiciones para la proliferación celular rápida y favorece la producción de biomasa, mientras que el segundo biorreactor tiene condiciones que llevan a la biosíntesis y

acumulación del producto bioquímico. La biomasa celular se recoge del biorreactor de la primera etapa y se usa como inóculo para el biorreactor de la segunda etapa. Como otro ejemplo, el primer reactor puede estar en modo continuo, mientras que el segundo puede ser de tipo discontinuo.

5 La masa celular procedente de este biorreactor sirve como una fuente continua de inóculo para el biorreactor de tipo discontinuo de la segunda etapa, que tiene condiciones necesarias para el desarrollo y maduración del embrión (pero no para la proliferación celular). El uso del biorreactor de primera etapa continuo puede ofrecer una o más ventajas, por ejemplo: (i) evita el tiempo, esfuerzo y coste necesarios para la limpieza, etc., de un reactor discontinuo entre dos experimentos, (ii) elimina la fase de retraso de los cultivos discontinuos, y (iii) proporciona una población celular más homogénea y que crece de forma activa.

10 Biorreactores de perfusión:

Los biorreactores están disponibles para cultivos de perfusión. Los ejemplos son los siguientes.

15 El sistema CellCube® de Corning Life Sciences proporciona un método rápido, simple y compacto para el cultivo en masa de células dependiente de la adhesión en un biorreactor perfusionado de forma continua. El sistema es un sistema fácilmente expandible para hacer crecer células adherentes en todos los niveles de producción de biomasa, vírica, y biomoléculas solubles. El sistema básico usa módulos CellCube® desechables con una superficie de crecimiento celular de 8.500 cm² a 85.000 cm², usando el mismo paquete de control. Los módulos de CellCube® tienen superficies de crecimiento de poliestireno que están disponibles con la superficie de cultivo tisular o la superficie CellBIND® de Corning avanzada, para la adhesión celular mejorada. Estos módulos de poliestireno desechables pueden contener 3,5 l de medios y contienen 25 platos paralelos para un área total de crecimiento de 21.000 cm² por cubo, expandible hasta 340.000 cm² (el apilamiento 4/100). Los cubos interconectables permanecen en una esquina, entrando los medios por la parte inferior y saliendo por la parte superior. El sistema CellCube® comprende cuatro piezas de equipo capital – el controlador del sistema, el oxigenador, las bombas de circulación y de medios. El controlador digital proporciona una monitorización en línea de la perfusión, pH, dO₂, y temperatura.

25 Biorreactores centrífugos

Otro tipo de biorreactor es un biorreactor centrífugo, por ejemplo el biorreactor centrífugo de CBR 2000 de Kinetic Biosystems. Diseñado para producción industrial, pueden lograr densidades de hasta 10.000 veces mayores que los biorreactores de tanque agitado. Los medios se alimentan a través del eje, y después se fuerzan hacia el exterior mediante la acción giratoria en la que entran en la cámara de reacción. Las células se mantienen en suspensión mediante fuerza centrífuga opuesta con perfusión. Los productos de desecho se eliminan a través del eje, y se toman muestras 10 veces por hora. El análisis en tiempo real de los parámetros de crecimiento y de producción significa que cualquier perturbación se puede ajustar rápidamente. El resultado final puede ser un rendimiento y calidad incrementados del producto. Cada cámara es capaz de producir 1×10^{16} células, teniendo cada rotor tres cámaras.

35 Microportador

Para estirpes celulares adheridas (por ejemplo, para cultivar células en el biorreactor), las densidades celulares obtenidas se pueden incrementar mediante la adición de perlas microportadoras. Estas pequeñas perlas tienen un diámetro de 30-1005 μm, y pueden estar hechas de, por ejemplo, dextrano, celulosa, gelatina, vidrio o sílice, y pueden incrementar la superficie específica disponible para la adhesión celular. El intervalo de microportadores disponibles significa que es posible hacer crecer la mayoría de los tipos celulares en este sistema.

Las partículas vienen en dos formas: sólida y porosa. Las perlas sólidas son las más manejables para cosechar biomasa, mientras que las perlas porosas son más adecuadas para productos segregados o lisados. Otras matrices contienen perlas estacionarias, creando un lecho sólido a través del que se perfusionan los medios.

45 Los cultivos de microportadores que usan perlas macroporosas suspendidas son fácilmente escalables. Estos sistemas son diferentes del cultivo de microportadores de superficie convencional por cuanto las células se inmovilizan a densidades elevadas dentro de los poros de la matriz y se protegen del cizallamiento del fluido. Otra ventaja de las perlas macroporosas es que se pueden inocular directamente desde el medio a granel, de la misma manera que los microportadores convencionales. Los sistemas de inmovilización de perlas suspendidas se pueden usar en un número de diferentes configuraciones de reactor, incluyendo lechos suspendidos o biorreactores de tanque agitado. Estos sistemas se pueden aumentar de escala incrementando el volumen del biorreactor y el número de perlas. También están disponibles las tecnologías de perlas macroporosas suspendidas. En un intento para imitar el entorno del cultivo celular en mamíferos, estas perlas macroporosas se pueden basar en colágeno (por ejemplo, colágeno, gelatina, o colágeno-glucosaminoglucano).

55 Por ejemplo, las microperlas de Porous ImmoBaSil producidas por Ashby Scientific están disponibles en diferentes tamaños y formas para la adaptación fácil a su vasija de cultivo particular. Son permeables a los gases, permitiendo que las densidades del cultivo alcancen 3×10^6 /ml para el rendimiento máximo de producto.

Amersham Pharmacia (AP) Biotech ofrece microportadores y reactores de lecho fluido. Las perlas Cytopore I están optimizadas para células de tipo CHO, mientras que Cytopore II es para células adherentes que requieran una densidad de carga superficial mayor. Las perlas Cytoline I son adecuadas para células resilientes que requieren velocidades de circulación elevadas. El portador Cytoline II de baja densidad está optimizado para células sensibles al cizallamiento, tales como hibridomas que necesitan una circulación más lenta. AP Biotech ha diseñado el reactor de perfusión con el sistema de lecho fluido Cytopilot para uso con sus perlas Cytoline.

El microportador de superficie de vidrio para el crecimiento de cultivos celulares se describe en la patente U.S. nº 4.448.884.

Además, la línea CYTOSTIR® (de Kontes) de biorreactores agitados de doble brazo lateral para el cultivo celular con microportadores se ha rediseñado completamente para mejorar el comportamiento y potenciar la capacidad de intercambio. Los biorreactores CYTOSTIR® están disponibles en nueve tamaños, que oscilan desde 100 ml hasta 36 litros. Los matraces de vidrio de borosilicato tienen dos grandes brazos laterales con cierres de tapa de rosca que permiten una toma de muestras fácil. La cúpula en el centro de la base del matraz evita que los microportadores se acumulen directamente en las palas agitadoras. Las grandes palas agitadoras de TEFLON® ajustables en altura se diseñan para proporcionar una eficacia máxima de agitación para mantener a los microportadores en suspensión a las velocidades bajas de agitación necesarias para el cultivo de tejidos. Durante la agitación, los cultivos sólo están en contacto con vidrio de borosilicato y TEFLON®. Todos los matraces de un litro y de tamaños más grandes tienen labios antigoteo y tapas de polipropileno con anillos de cierre. Todos los biorreactores CYTOSTIR® y componentes son sometibles completamente a autoclave de vapor.

Cultivo en matraces de agitación

Este es un método de cultivo habitual para estirpes en suspensión que incluyen hibridomas y estirpes adheridas que se han adaptado para crecer en suspensión. Los matraces de agitación son botellas de plástico o de vidrio con un eje agitador magnético central y brazos laterales para la adición y eliminación de células y medio, y gasificación con aire enriquecido con CO₂. Los matraces de agitación inoculados se colocan en un agitador y se incuban en las condiciones de cultivo apropiadas para la estirpe celular. Los cultivos se pueden agitar, por ejemplo, a 100-250 revoluciones por minuto. Los sistemas de matraces de agitación diseñados para manejar volúmenes de cultivo de 1-12 litros están disponibles de Techne, Sigma, y Bellco, por ejemplo (números de producto Z380482 de 3 l de capacidad y Z380474 de 1 l de capacidad). Otro ejemplo de sistemas de cultivo en matraces de agitación es el matraz de agitación de un solo uso MantaRay.

Wheaton Science Products ofrece sistemas de aumento de escala para todos los niveles de producción. Sus matraces de agitación Magna-Flex® tienen impulsores de vidrio de tipo flex, con forma de bulbo, para uso con microperlas. Una aguja retirable de acero inoxidable inmoviliza al impulsor para evitar el daño celular durante la manipulación. Disponibles en un intervalo de tamaños de 125 ml a 8 l, son completamente sometibles a autoclave. También está disponible el sistema Cell Optimizer™ para la determinación de las condiciones de cultivo óptimas antes del aumento de escala, y el OVERDRIVE™ para la producción económica a nivel industrial de hasta 45 l.

El SuperSpinner de B. Braun Biotech es un matraz agitado de nivel de entrada que aloja cultivos de 500 y 1000 ml, y presenta un sistema de aireación/agitación libre de burbujas. La serie Biostat® de vasijas agitadas maneja tamaños de cultivo de 50 ml a 10 l, e incluye sistemas completos listos para usar y sistemas que integran componentes preexistentes.

Techne UK ofrece una línea completa de matraces agitados en volúmenes de hasta 5 l. Diseñados con una varilla agitadora en lugar de con paletas, simplifican la limpieza y el autoclave eliminando rodamientos giratorios. La acción agitadora única crea un flujo vertical y horizontal en una espiral suave a través del cultivo. Su línea de plataformas de agitación programables presenta el control de aceleración/deceleración SOFTSTART™ para reducir el daño celular de la turbulencia excesiva.

Wheaton Science Products ofrece sistemas escalables para todos los niveles de producción. Sus matraces de agitación Magna-Flex® tienen impulsores de vidrio de tipo flex, con forma de bulbo, para uso con microperlas. Una aguja retirable de acero inoxidable inmoviliza al impulsor para evitar el daño celular durante la manipulación. Disponibles en un intervalo de tamaños de 125 ml a 8 l, son completamente sometibles a autoclave. También está disponible el sistema Cell Optimizer™ para la determinación de las condiciones de cultivo óptimas antes del aumento de escala, y el OVERDRIVE™ para la producción económica a nivel industrial de hasta 45 l.

Cultivo en matraces T

Los cultivos adherentes o en suspensión se pueden hacer crecer en matraces T, por ejemplo matraces T-25, T-76, T-225. Las tapas se pueden cerrar herméticamente con tapones o se pueden airear. Los matraces pueden ser de plástico o de vidrio. La superficie de los matraces se puede revestir, por ejemplo con restos hidrófilos que contengan una variedad de grupos funcionales cargados negativamente y/o grupos funcionales que contengan nitrógeno que soportan la adhesión, diseminación y diferenciación celulares. Los matraces T están disponibles, por ejemplo, de Nunc, Nalgene, Corning, Greiner, Schott, Pyrex, o Costar.

Placas de cultivo celular

Las células se pueden hacer crecer en placas de cultivo. La superficie de las placas se puede revestir, por ejemplo, con restos hidrófilos que contienen una variedad de grupos funcionales cargados negativamente y/o grupos funcionales que contienen nitrógeno que soportan la adhesión, diseminación y diferenciación celulares. Las placas están disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Corning, Greiner, Nunc, Nunclon, Pyrex.

Cultivo celular en suspensión

Las células suspendidas se pueden hacer crecer, por ejemplo, en biorreactores, placas, matraces, o botellas giratorias, por ejemplo, descritos aquí.

Sistemas de cultivo en suspensión estacionarios

Un ejemplo de un sistema de suspensión estacionario es CELLLine™ 1000. El dispositivo CELLLine™ 1000 (Integra Bioscience, Chur, Suiza) es un sistema de cultivo celular desechable a base de membrana. Está compuesto de dos compartimientos, una cámara de cultivo (20 ml) y un compartimiento de suministro de nutriente (1000 ml), separados mediante una membrana de diálisis semipermeable (corte de peso molecular 10 kD), que permite que pequeños nutrientes y factores de crecimiento se difundan a la cámara de producción. El suministro de oxígeno de las células y la difusión de CO₂ se producen a través de una membrana de silicona permeable a gases. Los anticuerpos se concentran en el medio de producción. Este sistema de cultivo requiere una incubadora de CO₂. Por ejemplo, para niveles de producción óptimos, el dispositivo se puede inocular con 50 x 10⁶ células, y 80% del medio de producción y todo el medio de nutrición se pueden cambiar dos veces a la semana.

Sistemas de cultivo en suspensión giratorios

Tales sistemas incluyen botellas giratorias (explicadas aquí). Un ejemplo de un sistema en suspensión giratorio es el miniPERM (Vivascience, Hannover, Alemania), que es un biorreactor de dos compartimientos de botella giratoria modificado, en el que el módulo de producción (35 ml) se separa del módulo del nutriente (450 ml) mediante una membrana de diálisis semipermeable. Los nutrientes y metabolitos se difunden a través de la membrana, y los anticuerpos segregados se concentran en el módulo de producción. La oxigenación y el suministro de CO₂ se producen a través de una membrana de silicona permeable a gases en el lado externo del módulo de producción, y a través de una segunda membrana de silicona extendida en el módulo de nutrición. El miniPERM se debe de colocar en una base giratoria dentro de una incubadora de CO₂. Es posible colocar dos bases giratorias juntas en una incubadora de CO₂ de 180 l, conteniendo cada una un máximo de cuatro biorreactores (es decir, se ocupa la misma cantidad de espacio para 1-4 incubaciones).

Botella giratoria

Este es el método usado más habitualmente para el aumento de escala inicial de células adheridas, también conocidas como estirpes celulares dependientes del anclaje. Las botellas giratorias son vasijas cilíndricas que giran lentamente (entre 5 y 60 revoluciones por hora) que bañan las células que están adheridas a la superficie interna con medio. Las botellas giratorias están disponibles típicamente con áreas superficiales de 1050 cm² (número de producto Z352969). El tamaño de algunas de las botellas giratorias presenta problemas puesto que son difíciles de manipular en el espacio confinado de una cabina de seguridad microbiológica. Recientemente, se han puesto a la venta botellas giratorias con superficies internas expandidas, que han hecho más manejable la manipulación de botellas con áreas superficiales grandes, pero si es posible se debería evitar las manipulaciones repetidas y el subcultivo con botellas giratorias. Un problema adicional con las botellas giratorias es la adhesión de las células, puesto que algunas estirpes celulares no se adhieren uniformemente. Esto es un problema particular con las células epiteliales. Esto se puede resolver parcialmente un poco optimizando la velocidad de rotación, generalmente disminuyendo la velocidad, durante el periodo de adhesión para células con baja eficiencia de adhesión.

Las botellas giratorias se usan en cualquier aplicación concebible. Siendo un buen punto de partida para pequeños laboratorios con necesidades de aumento de escala periódicas, también se usan para la producción industrial a gran escala. Debido a que los cultivos se siembran y mantienen de manera similar a los matraces, típicamente no es necesario ningún entrenamiento adicional. Los bastidores pequeños caben en incubadoras estándar, eliminando la necesidad de gastos adicionales de capital.

Las botellas giratorias se presentan en un número de configuraciones: plástico, vidrio, en pliegues, planas, aireadas, o sólidas. El vidrio se puede esterilizar y reusar, mientras que los diferentes plásticos y revestimientos optimizan el crecimiento para un surtido de tipos celulares. Los pliegues incrementan la superficie efectiva de crecimiento, incrementando de ese modo el rendimiento del producto sin necesidades espaciales adicionales. Las tapas aireadas se usan para cultivo en un entorno de CO₂, mientras que las tapas sólidas son las mejores para el cultivo en una habitación templada o una incubadora no regulada. Las botellas giratorias están disponibles, por ejemplo, de Corning.

Cultivo de células adherentes

Las células adherentes se pueden hacer crecer, por ejemplo, en biorreactores, placas, matraces, o botellas giratorias, por ejemplo, descritos aquí. Las superficies a las que se adhieren las células se pueden tratar o revestir para promover o soportar la adhesión, diseminación y/o diferenciación celulares. Los revestimientos incluyen lisina (por ejemplo, poli-D-lisina), polietilenimina, colágeno, glucoproteína (por ejemplo, fibronectina), gelatina, etc.

5 Matraz agitador

Los matraces agitadores se pueden usar para proporcionar una mayor agitación a los cultivos celulares para mejorar la transferencia de oxígeno o de gas, por ejemplo, en comparación con los cultivos estacionarios. Los matraces agitadores están disponibles, por ejemplo, de Pyrex y Nalgene.

Perfusión

10 Los sistemas de perfusión permiten la alimentación continua de la cámara celular desde la botella de medios externa, como se describe aquí. Las células son retenidas en la cámara celular (por ejemplo, biorreactor, biorreactor de perfusión de lecho, biorreactor de perfusión de lecho empaquetado). Los proveedores de sistemas de perfusión incluyen DayMoon Industries, Inc., y New Brunswick Scientific.

Cultivo celular de fibra hueca

15 Las fibras huecas son pequeños filtros similares a tubos con un corte de peso molecular predefinido. Los grandes haces de estas fibras se pueden empaquetar en módulos cilíndricos, que proporcionan una barrera absoluta a las células y anticuerpos a la vez que aseguran la perfusión del líquido. Los módulos de fibras huecas pueden proporcionar una gran área superficial en un pequeño volumen. Las paredes de las fibras huecas sirven como membranas de ultrafiltración semipermeables. Las células se hacen crecer en el espacio extracapilar que rodea las fibras, y el medio se perfusiona continuamente dentro de las fibras. Los metabolitos y los pequeños nutrientes perfusionan libremente entre el espacio extra- e intracapilar según gradientes de concentración. La monitorización del cultivo se puede llevar a cabo mediante la medida de lactato.

El ejemplo de tales sistemas incluye: el reactor de fibras huecas AcuSyst de Cellex Biosciences.

25 Otro ejemplo es el sistema Cell-Pharm® 100 (CP 100, BioVest, Minneapolis, MN), que es un sistema de cultivo celular de fibras huecas completamente integrado. La unidad de cultivo celular consiste en dos cartuchos: uno que sirve como un compartimiento celular, y el otro como una unidad de oxigenación. El sistema es un sistema de banco de laboratorio sin fijación con una trayectoria de flujo desechable con rendimientos de hasta 400 mg/mes.

30 El sistema Cell-Pharm® 2500 (CP2500, BioVest) es un sistema de producción de cultivo celular de fibras huecas que puede producir cantidades a gran escala de un producto producido por células, por ejemplo de anticuerpos monoclonales. A diferencia de CP100, consiste en dos cartuchos de fibras para las células, y por tanto ofrece una gran superficie de crecimiento celular (3,25 m²). Un tercer cartucho sirve para la oxigenación del medio.

35 El sistema de cultivo celular de fibras huecas FiberCell™ (FiberCell Systems Inc., Frederick, MD) está compuesto de un depósito de medio de cultivo (250 ml) y un cartucho de fibras de 60 ml (1,2 m²), conectados ambos a una única bomba controlada por microprocesador. Es posible prolongar los ciclos de suministro de medios sustituyendo el depósito de medio original por un matraz de 5 l. En contraste con los sistemas Cell-Pharm®, el biorreactor FiberCell™ se usa en una incubadora de CO₂. La oxigenación se produce mediante una tubería permeable a gases.

40 Cellex Biosciences fabrica reactores de fibras huecas para todos los niveles de producción. El AcuSyst-XCELL® está diseñado para la producción a gran escala de proteínas segregadas, produciendo 60 a 200 gramos de proteínas por mes. Su AcuSyst miniMax™ es un biorreactor de banco de laboratorio de escala de investigación flexible, capaz de producir hasta 10 g de proteína por mes. Para un solo uso o estudios piloto de una duración de unas pocas semanas, el RESCU-PRIMER™ económico produce hasta 200 mg por mes, con elección de matrices de fibras huecas y cerámicas.

45 El Unisyn Cell-Pharm® MicroMouse™ es un sistema desechable con una huella de 1,5 ft², que se ajusta en una incubadora de laboratorio estándar. Es capaz de producir hasta 250 mg de anticuerpos monoclonales por mes durante tres meses.

El TECNOMOUSE® de Integra Biosciences es un sistema de bastidor modular con cinco cámaras de casete separadas. Hasta cinco estirpes celulares diferentes se pueden cultivar durante un tiempo de hasta 30 semanas, produciendo cada uno 200 mg de anticuerpos por mes. El suministro de gas integrado y las capacidades de monitorización en línea ayudan a controlar las condiciones de cultivo.

50 Factorías celulares

Las factorías celulares se usan para cultivo celular a gran escala (por ejemplo, escala industrial) y productos de biomateriales tales como vacunas, anticuerpos monoclonales, o productos farmacéuticos. Las factorías se pueden usar para células adherentes o cultivo en suspensión. Las cinéticas de crecimiento son similares al cultivo a escala de laboratorio. Las factorías celulares proporcionan una gran cantidad de superficie de crecimiento en un área

pequeña, con manipulación fácil y un riesgo bajo de contaminación. Una factoría celular es un apilamiento cerrado de cámaras con puertos de ventilación y de llenado habituales. Se puede usar una factoría de 40 cámaras en lugar de 30 botellas giratorias. Las aberturas que conectan las cámaras hacen que los medios se introduzcan uniformemente para condiciones de crecimiento consistentes. Las ventilaciones se pueden cerrar o ajustar con ventilaciones de aire bacterianas. Las factorías celulares se pueden moldear a partir de, por ejemplo, poliestireno. Los proveedores de factorías celulares incluyen Nunc. La superficie de las factorías se puede tratar para mejorar las condiciones de crecimiento o de adhesión celular, por ejemplo se pueden tratar con Nunclon®Δ.

Nunclon® Cell Factories™ son cámaras de bajo perfil, desechables, de poliestireno, ventilables, que se presentan en apilamientos de uno, dos, 10 y 40. La inoculación, alimentación y cosechado son directos, debido al diseño innovador de las placas conectadas.

Bolsas de cultivo celular

Las bolsas de cultivo celular, por ejemplo bolsas de cultivo celular de un solo uso, se pueden usar para hacer crecer células de mamíferos, de insectos, y vegetales. Las bolsas son convenientes y flexibles para el cultivo en suspensión, de perfusión, y microportadores. Los proveedores de bolsas de cultivo celular incluyen DayMoon Industries, Inc. y Dunn Labor Technik GmbH.

El movimiento ondulatorio suave, inducido por la agitación de las bolsas, crea un entorno excelente de mezclado y oxigenación para el crecimiento celular. Equipadas con tubo de inmersión interno y filtro de malla, se simplifica el intercambio de los medios y el cultivo de perfusión con microportadores. Un puerto de tapa de rosca predefinido puede resultar conveniente para el acceso no restringido de perlas de microportadores, matriz de adhesión celular y cultivos tisulares.

El sistema de bolsa también ofrece una mayor flexibilidad en la transferencia de gases entre el espacio de cabeza de la bolsa y el entorno, y es capaz tanto de la difusión gaseosa como el enjuague gaseoso continuo. La difusión gaseosa a través de la membrana microporosa predefinida en la tapa de rosca proporciona intercambio gaseoso suficiente para la mayoría de la necesidad de cultivo celular. Si es necesario, se puede añadir aire a presión o gas a 1,5 psi a través de uno de los puertos luer y se puede ventear a través de la tapa de la membrana.

Como ejemplo, Optima™ es una bolsa de cultivo celular de un solo uso que ofrece conveniencia, capacidad y flexibilidad para hacer crecer células de insectos, vegetales y de mamíferos. Optima™ está diseñada para uso en agitadores de laboratorio convencionales o plataformas de balanceo. Disponible en dos bolsas estándar con capacidades de trabajo de hasta 4 l, la Optima™ es útil para un cultivo en suspensión de volumen elevado, que proporciona una alternativa económicamente eficaz a los biorreactores agitados. Las bolsas Optima-mini™ se diseñan para caber en la mayoría de los agitadores de laboratorio y plataformas de balanceo, no necesitando ningún equipo especializado.

Purificación de glucanos y glucoproteínas

Los parámetros de producción que incluyen purificación y formulación se pueden usar para producir una preparación de glucoproteína con una propiedad o propiedades de glucano deseadas. Para predisponer a las características de glucano de la preparación de glucoproteína purificada, se pueden usar diversos procedimientos de purificación. Por ejemplo, se pueden seleccionar métodos a base de afinidad, métodos a base de carga, métodos a base de polaridad, y métodos que distinguen basándose en el tamaño y/o agregación, para proporcionar una preparación de glucoproteína con una propiedad o propiedades de glucano deseadas. Por ejemplo, para separar glucanos y/o glucoproteínas basándose en la polaridad, se puede usar la cromatografía de líquidos de fase normal. La cromatografía de fase inversa se puede usar, por ejemplo, con azúcares derivatizados. Las columnas de intercambio aniónico se pueden usar para purificar azúcares sialilados, fosforilados y sulfatados. Otros métodos incluyen la cromatografía de intercambio iónico de pH elevado y la cromatografía de exclusión molecular, basada en la separación por tamaños.

Se pueden seleccionar métodos a base de afinidad que unen preferentemente ciertas unidades químicas y estructuras de glucano. Las matrices tales como ácido m-aminofenilborónico, lectinas inmovilizadas y anticuerpos se pueden unir a estructuras de glucano particulares. Las matrices de ácido m-aminofenilborónico pueden formar un enlace covalente temporal con cualquier molécula (tal como un hidrato de carbono) que contenga un grupo 1,2-cis-diol. El enlace covalente se puede destruir subsiguientemente para eluir la proteína de interés. Las lectinas son una familia de proteínas que reconocen hidratos de carbono, que presentan afinidades por diversos monosacáridos. Las lectinas se unen específica y reversiblemente a hidratos de carbono. Los monosacáridos primarios reconocidos por lectinas incluyen manosa/glucosa, galactosa/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, y ácido siálico (QProteome Glycoarray Handbook, Qiagen, Septiembre de 2005, disponible en: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Lectins/QIAGEN_GlycoArrayHandbook.pdf) o referencias similares. Las matrices de lectina (por ejemplo, columnas o conjuntos) pueden consistir en un número de lectinas con especificidades variables y/o solapantes para unirse a glucoproteínas con composiciones de glucano específicas. Algunas lectinas usadas habitualmente para purificar glucoproteínas incluyen concavalina A (a menudo acoplada a

Sepharose o agarosa) y germen de trigo. También se pueden generar anticuerpos anti-glucano mediante métodos conocidos en la técnica, y se pueden usar en columnas de afinidad para unir y purificar glucoproteínas.

La interacción de una lectina o anticuerpo con un ligando, tal como una glucoproteína, permite la formación de complejos reticulados, que son a menudo insolubles y se pueden identificar como precipitados (Varki et al., ed., "Protein-Glycan Interactions" in Essentials of Glycobiology disponible en la página web en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=glyco.section.269>) o referencias similares. En esta técnica, una cantidad fija de lectina o anticuerpo (receptor) se valora con una glucoproteína o un glucano, y a una relación precisa de ligando a receptor, se forma un precipitado (Varki et al.). Tal precipitación es muy específica para la constante de afinidad del ligando por el receptor (Varki et al.). Otro enfoque de precipitación aprovecha el hecho de que se puede "separar por sales" o precipitar mediante sulfato de amonio un complejo entre una lectina y un glucano (Varki et al.).

Producto de glucoproteína diana

Los métodos descritos aquí se pueden usar para proporcionar un producto de glucoproteína diana que tiene una propiedad o propiedades de glucano deseadas. Como se describe aquí, la propiedad o propiedades de glucano del producto de glucoproteína diana pueden ser las mismas o sustancialmente similares a un producto de glucoproteína primaria, o la propiedad o propiedades de glucano del producto de glucoproteína diana pueden ser diferentes de las del producto de glucoproteína primaria. Por ejemplo, la propiedad de glucano del producto de glucoproteína diana puede ser una característica de glucano que difiera de la característica de glucano de un producto de glucoproteína primaria tal como el grado de heterogeneidad de estructuras de glucano unidas a un sitio preseleccionado. En algunos casos, la propiedad de glucano puede ser, por ejemplo, una propiedad funcional que difiera del producto de glucoproteína diana primaria. Las propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, semivida sérica, aclaramiento, estabilidad *in vitro* (caducidad) o *in vivo*, afinidad de unión, distribución y selección de tejidos como dianas, toxicidad, inmunogenicidad, velocidad de absorción, velocidad de eliminación, y biodisponibilidad.

Se puede determinar y/o seleccionar un parámetro o parámetros de producción para producir un producto de glucoproteína que tiene una característica o características de glucano diferentes que, por ejemplo, se ha correlacionado con una propiedad funcional diferente del producto de glucoproteína primario. Se describen aquí correlaciones entre diversas características de glucano y propiedades funcionales con aquella característica que puede afectar. La Tabla III proporciona ejemplos de tales correlaciones.

Tabla III		
Glucano	Caracterización funcional	Fundamento
Terminal de ácido siálico	Biodisponibilidad	En algunos casos, un incremento en la sialilación conduce a una disminución correspondiente en la galactosa terminal expuesta, y a un incremento subsiguiente en la biodisponibilidad
	Selección de diana	En algunos casos, un incremento en la sialilación tiene el potencial de seleccionar como diana cualquier clase de lectinas que se unen a ácido siálico, que pueden incluir pero no se limitan a las selectinas (E, P y L) y siglecs (1-11). En algunos casos, esto puede incrementar el suministro a lo largo de la barrera hematoencefálica
	Afinidad del receptor	En algunos casos, una disminución en la sialilación puede conducir a un incremento en la afinidad del receptor (por ejemplo, disminución en la repulsión de la carga)
Terminal de galactosa	Biodisponibilidad	En algunos casos, un incremento en restos de galactosa terminal conduce a una biodisponibilidad disminuida (por ejemplo, unión incrementada al receptor de asiologlucoproteína (o lectina hepática) y endocitosis)
	Selección de diana	En algunos casos, un incremento en la galactosilación conduce a un aumento de la selección de diana o del complejamiento con proteínas que se unen a la galactosa, que pueden incluir, pero no se limitan a, las galectinas
	C1q	En algunos casos, un incremento en la galactosilación conduce a un incremento de C1q y citotoxicidad del complemento

Terminal de galactosa enlazada en alfa	Inmunogenicidad	En algunos casos, la presencia de galactosa terminal enlazada en alfa conduce a una mayor inmunogenicidad
Fucosilación	ADCC	En algunos casos, la presencia de un resto central de fucosa disminuye la actividad de ADCC
	Selección de diana	En algunos casos, la presencia de un resto de fucosa ramificado se puede usar para dirigir la proteína a receptores de lectina específicos, que pueden incluir pero no se limitan a las selectinas (E, P, y L)
Manosa elevada	Selección de diana	En algunos casos, la presencia de estructuras de tipo manosa elevada (incluyendo, pero sin limitarse a Man5, Man6, Man7, Man8 y Man9) se puede usar para dirigir la proteína hacia receptores específicos de manosa (que pueden incluir, pero no se limitan a, el receptor de manosa de macrófagos). En algunos casos, la presencia de estructuras de manosa elevada en factores de crecimiento (por ejemplo FGF) conduce a distribución específica al riñón
	Afinidad del receptor	En algunos casos, las estructuras de manosa elevada en TSH mostraron la mayor biopotencia para la señalización (por ejemplo cAMP y estimulación de IP)
Manosa-6-fosfato	Selección de diana	En algunos casos, la presencia de estructuras de manosa-6-fosfato se puede usar para dirigir la proteína a receptores específicos que pueden incluir pero no se limitan al receptor de manosa-6-fosfato
	Afinidad del receptor	En algunos casos, la presencia de estructuras de manosa-6-fosfato puede disminuir la afinidad del receptor (por ejemplo a través de repulsión de cargas)
Sulfatación	Selección de diana	En algunos casos, la presencia de glucanos sulfatados se puede usar para dirigir la proteína a receptores que pueden incluir pero no se limitan a las siglecs (1-11) y las selectinas (E, P, y L)
	Afinidad del receptor	En algunos casos, la presencia de glucanos sulfatados se puede usar para regular la afinidad de la proteína hacia su receptor diana a través de repulsión a base de cargas
Ácido N-glucosilneuramínico	Inmunogenicidad	En algunos casos, niveles elevados de ácido N-glucosilneuramínico pueden ser inmunógenos
Terminal de GlcNAc	Biodisponibilidad	En algunos casos, el incremento de restos de GlcNAc terminales disminuye la biodisponibilidad (por ejemplo unión al receptor de manosa)
Bisección de GlcNAc	Afinidad del receptor	En algunos casos, el incremento de los niveles de GlcNAc biseccantes aumenta la actividad de ADCC
Ocupación del sitio	Afinidad/función del receptor	En algunos casos, la ocupación del sitio puede controlar la afinidad del receptor. En algunos casos, el grado de ocupación del sitio puede controlar la citotoxicidad del Ab mediada por el complemento

La secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína diana puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína primaria, o la secuencia de aminoácidos puede diferir, por ejemplo en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 20 restos de aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína primaria. Las proteínas y sus fragmentos se pueden glucosilar en restos de arginina, denominada como glucosilación enlazada a N, y en restos de serina o treonina, denominada como glucosilación enlazada a O. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de un producto de glucoproteína diana se puede modificar para añadir un sitio para unir un resto de sacárido. La secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína diana se puede modificar, por ejemplo, para sustituir un aminoácido que no sirve como un sitio para glucosilación por un aminoácido que sirve como un sitio para

glucosilación. La secuencia de aminoácidos del producto de glucoproteína diana también se puede modificar sustituyendo un aminoácido que sirve como un sitio para un tipo de glucosilación, por ejemplo glucosilación enlazada mediante O, por un aminoácido que sirve como un sitio para un tipo diferente de glucosilación, por ejemplo una glucosilación enlazada a N. Además, se puede añadir un resto de aminoácido a una secuencia de aminoácidos para un producto de glucoproteína diana para proporcionar un sitio para unir un sacárido. La modificación de la secuencia de aminoácidos también se puede hacer en uno o más restos de aminoácidos no asociados con un sitio de glucosilación potencial. Una secuencia de aminoácidos de un producto de glucoproteína o la secuencia nucleotídica que lo codifica, se puede modificar mediante métodos conocidos en la técnica.

Implementación por ordenador ejemplar

Los métodos y artículos (por ejemplo sistemas o bases de datos) descritos aquí no necesitan ser implementados en un ordenador o forma electrónica. Una base de datos descrita aquí, por ejemplo, se puede implementar como una materia impresa.

En una implementación por ordenador ejemplar, la Figura 1 es un diagrama de bloques de los dispositivos de computación y sistemas 400, 450. El dispositivo de computación 400 está destinado a representar diversas formas de ordenadores digitales, tales como portátiles, ordenadores de mesa, estaciones de trabajo, asistentes digitales personales, servidores, servidores blade, macrocomputadoras, y otros ordenadores apropiados. El dispositivo de computación 450 está destinado a representar diversas formas de dispositivos móviles, tales como asistentes digitales personales, teléfonos celulares, teléfonos inteligentes y otros dispositivos de computación similares. Los componentes mostrados aquí, sus conexiones y relaciones, y sus funciones, pretenden ser simplemente ejemplares, y no pretenden limitar las implementaciones descritas y/o reivindicadas en este documento.

El dispositivo de computación 400 incluye un procesador 402, una memoria 404, un dispositivo de almacenamiento 406, una interfaz 408 de alta velocidad que se conecta a la memoria 404 y puertos 410 de expansión de alta velocidad, y una interfaz 412 de baja velocidad que se conecta a un enlace 414 de baja velocidad y un dispositivo de almacenamiento 406. Cada uno de los componentes 402, 404, 406, 408, 410 y 412 están interconectados usando diversos enlaces, y se pueden montar en una placa madre normal o de otras maneras, según sea apropiado. El procesador 402 puede procesar instrucciones para la ejecución en el dispositivo de computación 400, incluyendo instrucciones almacenadas en la memoria 404 o en el dispositivo de almacenamiento 406 para presentar información gráfica para una GUI en un dispositivo externo de entrada/salida, tal como una pantalla 416 acoplada a un interfaz 408 de alta velocidad. En otras implementaciones, se pueden usar múltiples procesadores y/o múltiples enlaces, según sea apropiado, junto con múltiples memorias y tipos de memoria. También, se pueden conectar múltiples dispositivos de computación 400, proporcionando cada dispositivo porciones de las operaciones necesarias (por ejemplo como un banco de servidores, un grupo de servidores blade, o un sistema de múltiples procesadores).

La memoria 404 almacena información en el dispositivo de computación 400. En una implementación, la memoria 404 es un medio legible por ordenador. En una implementación, la memoria 404 es una unidad o unidades de memoria volátil. En otra implementación, la memoria 404 es una unidad o unidades de memoria no volátil.

El dispositivo de almacenamiento 406 es capaz de proporcionar almacenamiento masivo para el dispositivo de computación 400. En una implementación, el dispositivo de almacenamiento 406 es un medio legible por ordenador. En diversas implementaciones diferentes, el dispositivo de almacenamiento 406 puede ser un dispositivo de disquete, un dispositivo de disco duro, un dispositivo de disco óptico, o un dispositivo de cinta, una memoria rápida u otro dispositivo de memoria de estado sólido similar, o un conjunto de dispositivos, incluyendo dispositivos en una red de área de almacenamiento u otras configuraciones. En una implementación, un producto de programa de ordenador se presenta tangiblemente en un soporte de información. El producto de programa de ordenador contiene instrucciones que, cuando se ejecutan, llevan a cabo uno o más métodos, tales como los descritos anteriormente. El soporte de información es un medio legible por ordenador o por una máquina, tal como la memoria 404, el dispositivo de almacenamiento 406, la memoria en el procesador 402, o una señal propagada.

El controlador 408 de alta velocidad maneja operaciones intensivas de anchura de banda para el dispositivo de computación 400, mientras que el controlador 412 de baja velocidad maneja operaciones intensivas de anchura de banda más baja. Tal asignación de tareas sólo es ejemplar. En una implementación, el controlador 408 de alta velocidad está acoplado a la memoria 404, a la pantalla 416 (por ejemplo, a través de un procesador o acelerador gráfico), y a puertos 410 de expansión de alta velocidad, que pueden aceptar diversas tarjetas de expansión (no mostradas). En la implementación, el controlador 412 de baja velocidad está acoplado al dispositivo de almacenamiento 406 y al puerto 414 de expansión de baja velocidad. El puerto de expansión de baja velocidad, que puede incluir diversos puertos de comunicación (por ejemplo, USB, Bluetooth, Ethernet, Ethernet inalámbrica), se puede acoplar a uno o más dispositivos de entrada/salida, tales como un teclado, un dispositivo de puntero, un escáner, o un dispositivo de red, tal como un conmutador o un enrutador, por ejemplo a través de un adaptador de red.

El dispositivo de computación 400 se puede implementar en un número de diferentes formas, como se muestra en la figura. Por ejemplo, se puede implementar como un servidor estándar 420, o múltiples veces en un grupo de tales

servidores. También se puede implementar como parte de un sistema 424 de servidores de bastidor. Además, se puede implementar en un ordenador personal, tal como un portátil 422. Como alternativa, los componentes para el dispositivo de computación 400 se pueden combinar con otros componentes en un dispositivo móvil (no mostrado), tal como el dispositivo 450. Cada uno de tales dispositivos puede contener uno o más de los dispositivos de computación 400, 450, y un sistema completo puede estar formado de múltiples dispositivos de computación 400, 450 que se comunican entre sí.

El dispositivo de computación 450 incluye un procesador 452, una memoria 464, un dispositivo de entrada/salida tal como una pantalla 454, una interfaz 466 de comunicación, y un transmisor-receptor 468, entre otros componentes. El dispositivo 450 también se puede proporcionar con un dispositivo de almacenamiento, tal como un disco duro de una pulgada (microdrive) u otro dispositivo, para proporcionar almacenamiento adicional. Cada uno de los componentes 450, 452, 464, 454, 466 y 468 se interconectan usando diversos enlaces, y varios componentes se pueden montar en una placa madre normal o de otras maneras, según sea apropiado.

El procesador 452 puede procesar instrucciones para la ejecución en el dispositivo de computación 450, incluyendo instrucciones almacenadas en la memoria 464. El procesador también puede incluir procesadores analógicos y digitales separados. El procesador puede proporcionar, por ejemplo, coordinación de los otros componentes del dispositivo 450, tal como el control de las interfaces del usuario, ejecución de aplicaciones mediante el dispositivo 450, y la comunicación inalámbrica mediante el dispositivo 450.

El procesador 452 se puede comunicar con el usuario a través de la interfaz 458 de control y la interfaz 456 de pantalla acoplada a una pantalla 454. La pantalla 454 puede ser, por ejemplo, una pantalla TFT LCD o una pantalla OLED, u otra tecnología de pantalla apropiada. La interfaz 456 de pantalla puede comprender una circuitería apropiada para hacer que la pantalla 454 presente información gráfica y otra información a un usuario. La interfaz de control 458 puede recibir comandos desde un usuario y convertirlos para su entrega al procesador 452. Además, se puede proporcionar una interfaz externa 462 en comunicación con el procesador 452, para permitir una comunicación de área cercana del dispositivo 450 con otros dispositivos. La interfaz externa 462 puede proporcionar, por ejemplo, comunicación por cable (por ejemplo, vía un procedimiento de acoplamiento) o comunicación inalámbrica (por ejemplo, vía Bluetooth u otra de tales tecnologías).

La memoria 464 almacena información en el dispositivo de computación 450. En una implementación, la memoria 464 es un medio legible por ordenador. En una implementación, la memoria 464 es una unidad o unidades de memoria volátil. En otra implementación, la memoria 464 es una unidad o unidades de memoria no volátil. También se puede proporcionar y conectar una memoria de expansión 474 al dispositivo 450 a través de la interfaz 472 de expansión, que puede incluir, por ejemplo, una interfaz de tarjeta SIMM. Tal memoria de expansión 474 puede proporcionar un espacio de almacenamiento extra para el dispositivo 450, o también puede almacenar aplicaciones u otra información para el dispositivo 450. Específicamente, la memoria de expansión 474 puede incluir instrucciones para llevar a cabo o suplementar los procesos descritos anteriormente, y puede incluir también información segura. De este modo, por ejemplo, la memoria de expansión 474 se puede proporcionar como un módulo de seguridad para el dispositivo 450, y se puede programar con instrucciones que permiten el uso seguro del dispositivo 450. Además, se pueden proporcionar aplicaciones seguras vía las tarjetas SIMM, junto con información adicional, tal como colocar información identificativa en la tarjeta SIMM de una manera no pirateable.

La memoria puede incluir, por ejemplo, memoria rápida y/o memoria MRAM, como se explica más abajo. En una implementación, un producto de programa de ordenador está contenido tangiblemente en un soporte de información. El producto de programa de ordenador contiene instrucciones que, cuando se ejecutan, llevan a cabo uno o más métodos, tales como los descritos anteriormente. El soporte de información es un medio legible por ordenador o por una máquina, tal como la memoria 464, la memoria de expansión 474, la memoria en el procesador 452, o una señal propagada.

El dispositivo 450 se puede comunicar de forma inalámbrica a través de la interfaz 466 de comunicación, que puede incluir un circuito de procesamiento de señal digital cuando sea necesario. La interfaz 466 de comunicación puede proporcionar comunicaciones en diversos modos o protocolos, tales como las llamadas de voz de GSM, mensajería SMS, EMS, o MMS, CDMA, TDMA, PDC, WCDMA, CDMA2000, o GPRS, entre otros. Tal comunicación se puede producir, por ejemplo, a través de un transmisor-receptor 468 de radiofrecuencia. Además, se puede producir la comunicación de corto alcance, tal como usando un Bluetooth, WiFi, u otro de dicho transmisor-receptor (no mostrado). Además, el módulo receptor 470 de GPS puede proporcionar datos inalámbricos adicionales al dispositivo 450, que se pueden usar según sea apropiado por aplicaciones que se ejecutan en el dispositivo 450.

El dispositivo 450 también se puede comunicar de forma audible usando un código de audio 460, que puede recibir información oral de un usuario y convertirla en una información digital utilizable. El código de audio 460 puede generar igualmente un sonido audible para un usuario, tal como a través de un altavoz, por ejemplo en un microteléfono del dispositivo 450. Tal sonido puede incluir un sonido procedente de llamadas telefónicas de voz, puede incluir un sonido grabado (por ejemplo, mensaje de voz, archivos de música, etc.), y también puede incluir sonido generado mediante aplicaciones que operan en el dispositivo 450.

El dispositivo de computación 450 se puede implementar de muchas formas diferentes, como se muestra en la figura. Por ejemplo, se puede implementar como un teléfono móvil 480. También se puede implementar como parte de un teléfono inteligente 482, asistente digital personal, u otro dispositivo móvil similar.

5 Cuando sea apropiado, los sistemas y las operaciones funcionales descritos en esta memoria descriptiva se pueden implementar en un circuito electrónico digital, o en software de ordenador, soporte lógico inalterable, o hardware, incluyendo los medios estructurales descritos en esta memoria descriptiva y sus equivalentes estructurales, o en combinaciones de ellos. Las técnicas se pueden implementar como uno o más productos de programa de ordenador, es decir, uno o más programas de ordenador contenidos tangiblemente en un soporte de información, por ejemplo en un dispositivo de almacenamiento legible por una máquina o en una señal propagada, para ejecución
10 mediante, o para controlar la operación de, un aparato procesador de datos, por ejemplo un procesador programable, un ordenador, o múltiples ordenadores. Un programa de ordenador (también conocido como programa, software, aplicación de software, o código) puede estar escrito en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, y se puede utilizar en cualquier forma, incluyendo un programa por sí mismo, o como un módulo, componente, subrutina, u otra unidad adecuada para uso en un entorno de computación. Un programa de ordenador no corresponde necesariamente a un archivo. Un programa se puede almacenar en una porción de un archivo que contiene otros programas o datos, en un archivo individual dedicado al programa en cuestión, o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenan uno o más módulos, subprogramas, o porciones de código). Un programa de ordenador se puede utilizar para ser ejecutado en un ordenador o en múltiples ordenadores en un sitio o a lo largo de múltiples sitios distribuidos e
20 interconectados mediante una red de comunicación.

Los procesos y flujos lógicos descritos en esta memoria descriptiva se pueden llevar a cabo mediante uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas de ordenador para llevar a cabo las funciones descritas operando sobre datos de entrada y generando salida. Los procesos y flujos lógicos también se pueden llevar a cabo mediante, y el aparato se puede implementar como, un circuito lógico para un fin especial, por ejemplo un FPGA (conjunto de puertas programables de campo) o un ASIC (circuito integrado específico de la aplicación).
25

Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa de ordenador incluyen, a título de ejemplo, microprocesadores para fines tanto generales como especiales, y uno cualquiera o más procesadores de cualquier tipo de ordenador digital. Generalmente, el procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de sólo lectura o una memoria de acceso aleatorio, o de ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para ejecutar instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. Generalmente, un ordenador incluirá, o estará acoplado de forma operativa para recibir datos de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo discos magnéticos, magnetoópticos, y discos ópticos. Los soportes de información adecuados para contener instrucciones de programas de ordenador y datos incluyen todas las formas de memoria no volátil, incluyendo, a título de ejemplo, dispositivos de memoria de semiconductores, por ejemplo EPROM, EEPROM, y dispositivos de memoria rápida; discos magnéticos, por ejemplo discos duros internos o discos retirables; discos magnetoópticos; y discos CD ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria se pueden suplementar mediante, o se pueden incorporar en, un circuito lógico para fines especiales.
30
35

Para proporcionar interacción con un usuario, se pueden implementar aspectos de las técnicas descritas en un ordenador que tenga un dispositivo de presentación, por ejemplo un monitor CRT (tubo de rayos catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido), para presentar la información al usuario, y un teclado y un dispositivo de puntero, por ejemplo un ratón o un puntero de bola, mediante el cual el usuario puede proporcionar entrada al ordenador. Igualmente se pueden usar otros tipos de dispositivos para proporcionar interacción con un usuario; por ejemplo, la realimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de realimentación sensorial, por ejemplo realimentación visual, realimentación auditiva, o realimentación táctil; y la entrada desde el usuario se puede recibir de cualquier forma, incluyendo entrada acústica, oral, o táctil.
40
45

Las técnicas se pueden implementar en un sistema de computación que incluye un componente de etapa final, como un servidor de datos, o que incluye un componente de soporte intermedio, por ejemplo un servidor de aplicación, o que incluye un componente de preparación, por ejemplo un ordenador de un cliente que tiene una interfaz de usuario gráfica o un navegador de Internet a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación, o cualquier combinación de tales componentes de etapa final, de soporte intermedio, o de preparación. Los componentes del sistema se pueden interconectar mediante cualquier forma o medio de comunicación de datos digital, por ejemplo una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), por ejemplo el Internet.
50

El sistema de computación puede incluir clientes y servidores. Un cliente y servidor generalmente son remotos entre sí e interactúan típicamente a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de programas de ordenador que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación de cliente-servidor entre sí.
55

Otras modificaciones post-traduccionales

Los métodos, bases de datos y productos se describen aquí principalmente con referencia a la glucosilación, pero también incluyen métodos análogos en los que otras modificaciones post-traduccionales se enfocan de la misma manera que la glucosilación. Los ejemplos de modificación post-traduccionales que se pueden incluir son: proteólisis, racemización, desplazamiento de acilo de N-O, multimerización, agregación, modificación de azúcares, biotilación, nedilación, acilación, formilación, miristoilación, formación de piroglutamato, metilación, glucación, carbamilación, amidación, adición de glucosil fosfatidilinositol, O-metilación, gliptación, ubiquitinación, SUMOilación, metilación, acetilación, hidroxilación, ubiquitinación, SUMOilación, formación de desmosina, desaminación y oxidación a aldehído, O-glucosilación, formación de iminas, glicación, carbamilación, formación de enlaces de disulfuro, prenilación, palmitoilación, fosforilación, desfosforilación, glucosilación, sulfatación, enlace de anillo de porfirina, enlace de flavina, formación de grupo prostético GFP (secuencia Thr-Tyr-Gly), formación de lisina tirosina quinona (LTQ), formación de topaquinona (TPQ), formación de succinimida, transglutaminación, carboxilación, poliglutamilación, poliglicilación, citrulinación, metilación e hidroxilación.

Esta invención y descripción se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deberían de interpretar como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo I: Correlaciones entre diversos parámetros de producción y propiedades de glucano para la producción en células CHO

Se estudiaron diversos parámetros de producción de medios para determinar el efecto, si lo hay, del ajuste del parámetro de la producción de medios que tuvo sobre las características de glucano de un anticuerpo anti-IL-8 producido en células CHO deficientes en dhfr. Las células se cultivaron en matraces T. Los resultados se proporcionan más abajo en la Tabla VI. La Tabla VI indica cada parámetro de producción (Columna A) y característica de glucano (Fila A) que se evaluó. El resto de los parámetros de producción se mantuvo constante a lo largo de la evaluación. Se señalan ciertos efectos que un parámetro de producción tiene sobre una característica de glucano.

Tabla VI

A	Galactosilación	Fucosilación	Contenido elevado de manosa	Híbrido	Sialilación
Manosa					
Glucosamina	Disminuyó	Disminuyó	Aumentó	Aumentó	
ManNAc					
Butirato	Aumentó				
450 mOsm		Disminuyó			
Amoníaco	Disminuyó	Disminuyó	Aumentó		
32°C					
15% de CO ₂		Disminuyó			
Manganeso		Disminuyó			
Glucosamina con uridina					
Uridina			Disminuyó		

El contenido de glucosamina se evaluó a 0,3 mM, 10 mM y 20 mM de contenido de glucosamina.

Puesto que la porción Fc de las moléculas de IgG está bloqueada de la sialilación (probablemente debido a impedimento estérico de la cadena principal de proteína), se observó poco incremento en la sialilación tras la suplementación con ManNAc (*). En un segundo ejemplo, se cultivaron células CHO que expresan un constructo de fusión CTLA4-Ig en presencia de ManNAc elevada. Puesto que esta molécula no está impedida estéricamente, los niveles de ácido siálico aumentaron significativamente en presencia de ManNAc elevada.

Ejemplo II: Correlación de relaciones aditivas no lineales entre los parámetros de producción y propiedades de glucano para la producción en células CHO

5 Se estudiaron diversos parámetros de producción de medios para determinar el efecto, si lo hay, del ajuste que ese parámetro de producción de medios tuvo sobre las características de glucano de un anticuerpo IgG humano producido en células CHO deficientes en dhfr. Las células se cultivaron en matraces T. La proteína se cosechó entonces, los glucanos se liberaron mediante digestión enzimática con Péptido:N-glucosidasa F (PNGasa-F), y se
10 aislaron. PNGasa-F es una amidasa que rompe entre GlcNAc más interna y los restos de asparagina de oligosacáridos con contenido elevado de manosa, híbridos, y complejos, procedentes de glucoproteínas enlazadas mediante N (Marley et al., 1989, Anal. Biochem., 180:195). PNGasa-F puede hidrolizar a casi todos los tipos de cadenas de N-glucano de glucopéptidos y/o glucoproteínas. La muestra de glucano resultante se purificó usando cartuchos de extracción de fase sólida de carbono grafitizado activado, y se marcaron en sus términos reductores con un marcador fluorescente, 2-benzamida. Los glucanos marcados se resolvieron subsiguientemente mediante NP-HPLC usando una columna de amida, y se determinaron sus patrones. Véase la Fig. 2. Los perfiles de glucano se normalizaron para el nivel de proteína, y finalmente se expresaron como un porcentaje del área de pico de glucano total.

15 Los patrones de glucanos en el anticuerpo producido en presencia de glucosamina elevada, uridina, o tanto uridina como glucosamina, se ilustran en la Fig. 3. El patrón del perfil de glucano observado en IgG producida en presencia tanto de uridina como de glucosamina no se predice a partir de los perfiles observados de un anticuerpo producido en presencia de uridina o glucosamina individualmente. Por ejemplo, la relación entre los parámetros de producción y las características de glucano representada por picos A, B, D, M, T y V es no lineal.

Equivalentes

20 Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, sin usar más experimentación de la habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes están destinados a estar englobados mediante las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un producto de glucoproteína que tiene una propiedad de glucano diana, comprendiendo el método:

5 en un sistema de ordenador (400, 450) que tiene una base de datos, almacenar el sistema de ordenador una pluralidad de propiedades de glucano y correlacionar, en la base de datos, cada una de la pluralidad de propiedades de glucano con uno o más parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción,

i) introducir en el sistema de ordenador una propiedad de glucano diana seleccionada de galactosilación, fucosilación, manosa elevada, estructuras híbridas, y sus combinaciones;

10 ii) seleccionar, mediante el sistema de ordenador a partir de la base de datos, una pluralidad de parámetros de producción o combinaciones de parámetros de producción que se correlaciona con la propiedad de glucano diana, en el que al menos una combinación seleccionada de parámetros de producción y la propiedad de glucano diana están correlacionados en dicha base de datos mediante una función correlativa no lineal o una función correlativa constreñida, y en el que dicha al menos una combinación seleccionada de parámetros de producción incluye un primer parámetro de producción y un segundo parámetro de producción, en el que dicho primer parámetro de producción es el contenido de glucosamina de un medio de cultivo celular, y dicho segundo parámetro de producción es el contenido de uridina de un medio de cultivo celular;

15 iii) extraer del sistema de ordenador los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción; y

20 iv) aplicar los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción en un procedimiento para obtener el producto de glucoproteína, etapa de aplicación la cual comprende incorporar los parámetros de producción seleccionados o las combinaciones de parámetros de producción en un sistema de producción y mantener dicho sistema en condiciones que permitan la producción del producto de glucoproteína,

obteniendo de ese modo el producto de glucoproteína;

en el que:

25 la función correlativa no lineal representa una relación en la que el efecto de dicho primer parámetro de producción y dicho segundo parámetro de producción que actúan juntos sobre dicha propiedad de glucano diana no es la misma que la combinación de dicho primer parámetro de producción que actúa solo sobre dicha propiedad de glucano diana junto con el efecto de dicho segundo parámetro de producción que actúa solo sobre dicha propiedad de glucano diana; y

30 la función correlativa constreñida se refiere a un valor para dicho primer parámetro de producción a un valor para dicha propiedad de glucano diana seleccionada de galactosilación y manosa elevada, y también identifica uno o ambos de: una segunda propiedad de glucano que es alterada por dicho primer parámetro de producción; y que dicho segundo parámetro de producción se puede usar junto con el primer parámetro de producción para modular el efecto global de dicho primer parámetro de producción en una segunda propiedad de glucano.

35 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

recibir, como entrada al sistema de ordenador (400, 450), un valor alterado de un parámetro de producción seleccionado o combinación de parámetros de producción, y seleccionar, mediante el sistema de ordenador a partir de la base de datos, el efecto correlacionado del valor alterado en la propiedad de glucano.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

40 estudiar la glucoproteína, o su cultivo celular, para determinar cualquiera de contenido de endotoxina, esterilidad, contenido de micoplasma, lixiviados, contaminantes de ADN de células hospedantes (por ejemplo CHO) o de proteína; y

registrar los contaminantes del proceso de la glucoproteína, o su cultivo celular.

4. El método de la reivindicación 1, en el que se seleccionan 2, 3, 4 ó 5 parámetros de producción.

45 5. Un medio legible por ordenador que comprende un código que, cuando se ejecuta en un sistema de procesamiento de datos, lleva a cabo las etapas (i), (ii) y (iii) del método de la reivindicación 1.

6. Un sistema de ordenador (400, 450) que comprende medios para llevar a cabo las etapas (i), (ii) y (iii) del método de la reivindicación 1.

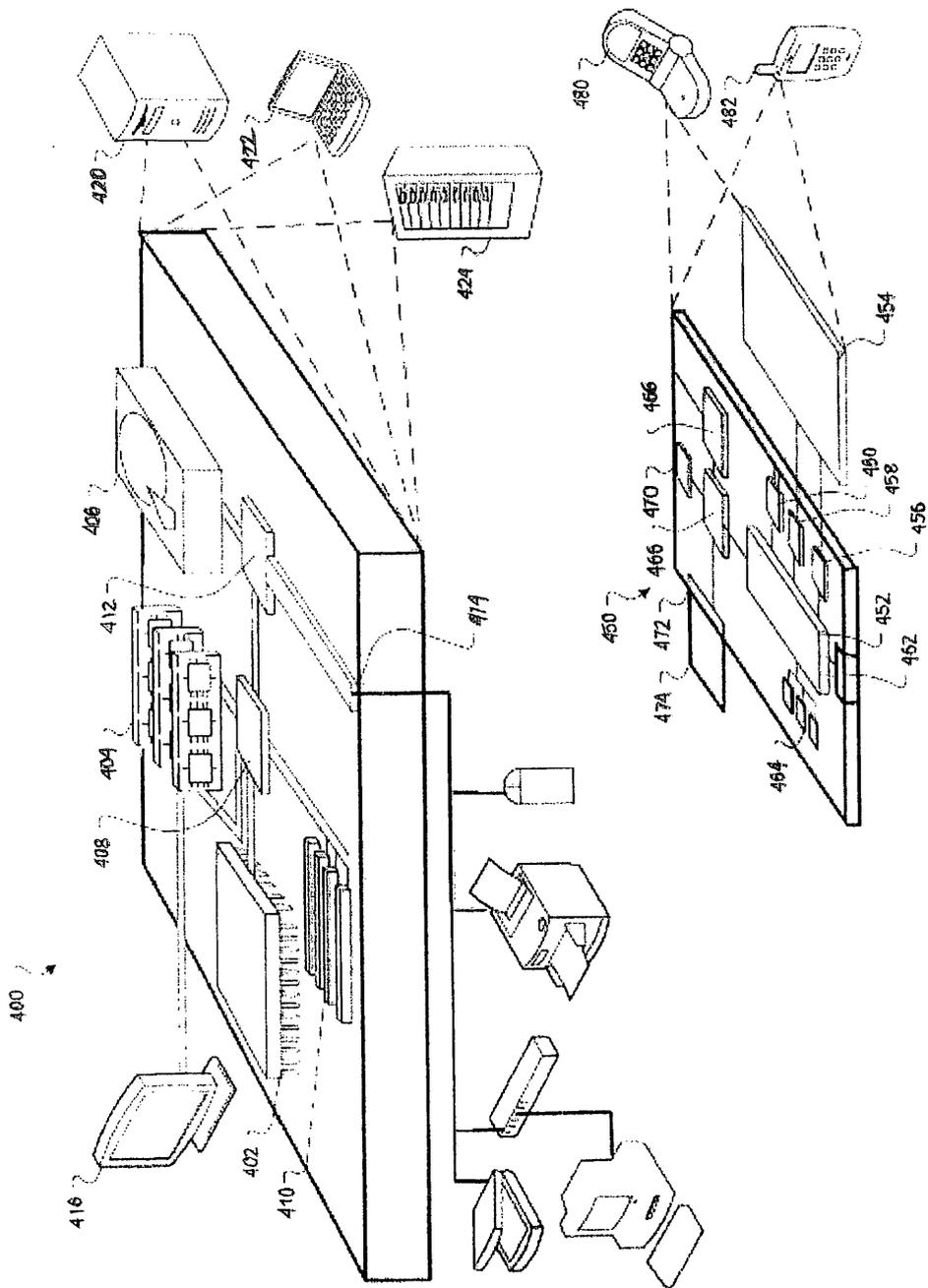


FIG. 1

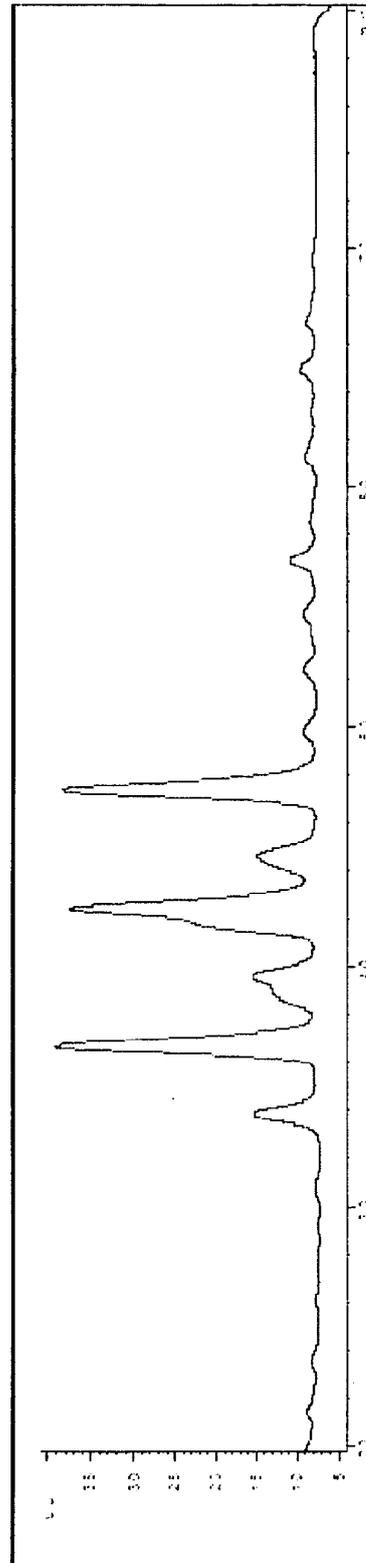


Fig.2

FIG.3

