

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 656**

51 Int. Cl.:  
**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07717002 .5**  
96 Fecha de presentación: **23.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1984517**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Métodos para modular el contenido de manosa de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:  
**23.01.2006 US 761477 P**  
**22.12.2006 US 644345**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2012**

73 Titular/es:  
**AMGEN INC. (100.0%)**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, CA 91320, US**

72 Inventor/es:  
**WU, JIAN;**  
**LE, NICOLE;**  
**DE LA CRUZ, MICHAEL y**  
**FLYNN, GREGORY**

74 Agente/Representante:  
**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 391 656 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Metodos para modular el contenido de manosa de proteínas recombinantes.

## 5 Antecedentes de la Invención

10 Los eucariotas superiores realizan una variedad de modificaciones post-translacionales, incluyendo metilación, sulfatación, fosforilación, adición de lípidos y glicosilación. Dichas modificaciones pueden ser de importancia crítica para la función de una proteína. Las proteínas secretadas, las proteínas de membrana, y las proteínas dirigidas a vesículas o ciertos orgánulos intracelulares es proba le que sean glicosiladas.

15 La glicosilación N-ligada es una forma de glicosilación que implica la adición de oligosacáridos a un residuo de asparagina encontrado en secuencias de reconocimiento (por ejemplo, Asn-X-Ser/Thr) en proteínas. Las glicoproteínas N-ligadas contiene estructuras ramificadas estándares, que están compuestas de manosa (Man), galactosa, N-acetilglucosamina (GlcNac), y ácidos neurámicos. La N-glicosilación de la proteína típicamente se origina en el retículo endoplásmico (ER), donde un oligosacárido N-ligado (por ejemplo  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) montado en dolicol (un intermediario portador lípido) se transfiere a la Asparagina (Asn) apropiada de una proteína naciente. Este es un suceso común a todas las glicoproteínas N-ligadas eucariotas. Hay dos tipos principales de sacáridos N-ligados: oligosacáridos ricos en manosa, y oligosacáridos complejos.

20 Los oligosacáridos ricos en manosa típicamente incluyen dos N-acetilglucosaminas con muchos residuos de manosa (por ejemplo, más d e4). Los oligosacáridos complejos se llaman así porque pueden contener casi cualquier número de los otros tipos de sacáridos, incluyendo más de las dos N-acetilglucosaminas originales. Las proteínas pueden ser glicosiladas por ambos tipos de oligosacáridos en diferentes partes de la proteína. Si un oligosacárido es rico en manosa o complejo se cree que depende de su accesibilidad a las proteínas que modifican los sacáridos en el aparato Golgi. Si el sacárido es relativamente inaccesible, permanecerá más probablemente en su forma rica en manosa original. Si es accesible, entonces es probable que muchos de los residuos de manosa sean escindidos y el sacárido será además modificado por la adición de otros tipos de grupos como se ha mencionado anteriormente.

25 Después de que una cadena de oligosacáridos se ha añadido a una proteína, los tres residuos de glucosa y uno de manosa se retiran por tres enzimas diferentes en un orden fijado. Este suceso ocurre en el ER y es una señal de que la proteína puede ser transportada a un Golgi para procesamiento adicional. Después del procesamiento en el ER, se forma el oligosacárido del tipo rico en manosa. Los tres residuos de glucosa y un residuo de manosa alfa-1,2 ligado específico son retirados por glucosidasas específicas y una alfa-1,2-manosidasa en el ER, resultando en la estructura del oligosacárido central,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . La proteína con su estructura de azúcar central se transporta al aparato Golgi donde la porción de azúcar experimenta varias modificaciones.

30 En las células mamíferas, la modificación de la cadena de azúcar procede por 3 sistemas diferentes dependiendo de la porción de proteína a la que se añade. Los tres sistemas diferentes son: (1) la cadena de azúcar central no cambia; (2) la cadena de azúcar central se cambia añadiendo la porción N-acetilglucosamina-1-fosfato ( $\text{GlcNAc-1-P}$ ) en UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) a la posición 6 de la manosa en la cadena de azúcar central, seguido por la retirada de la porción GlcNac para formar una cadena de azúcar ácida en la glicoproteína; o (3) la cadena de azúcar central se convierte primero en  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  retirando 3 residuos de manosa con manosidasa I; la  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  se modifica adicionalmente añadiendo GlcNAc y retirando 2 residuos de manosa más, seguido por la adición secuencialmente de GlcNAc, galactosa (Gal), y ácido N-acetilneuramínico (también llamado ácido siálico (neuNAc)) para formar varias cadenas de azúcar híbridas o complejas (R. Kornfeld y S. Kornfeld, Ann. Rev. Biochem. 54: 631-664 (1985); Chib ay otros, J. Biol. Chem. 273: 26298-26304 (1998)).

35 El contenido de oligosacáridos de las proteínas recombinantes puede afectar a la seguridad y eficacia de las glicoproteínas terapéuticas. En consecuencia, los métodos para controlar el contenido de oligosacáridos, particularmente el contenido de manosa, de dichas glicoproteínas sería beneficioso.

40 H. Li y otros (Nature Biotechnology 24:210-215 (2006)) describen que los anticuerpos humanos con estructuras de N-glicanos humanas se pueden producir en líneas glicodiseñadas de *Pichia pastoris*. L. Zhu y otros (Nature Biotechnology; 23: 1159-1169 (2005)) describen un método para la producción de anticuerpos monoclonales que tienen glicosilación no antigénica en huevos de pollos quiméricos.

45 En la WO 02/00879 A, se describen métodos para la producción de glicoproteínas modificadas en líneas celulares que tienen sistemas de glicosilación genéticamente modificados, que imitan el procesamiento de glicoproteínas en humanos.

50 El contenido rico en manosa de composiciones de glicoproteínas, particularmente anticuerpos terapéuticos, puede afectar significativamente a la seguridad y eficacia de dichas proteínas durante el uso terapéutico. Sin estar atados a una teoría particular, la evidencia sugiere que las glicoproteínas ricas en manosa son eliminadas de la circulación más rápido que sus equivalentes de manosa baja debido a, por ejemplo, los receptores de manosa en los

macrófagos y las células dendríticas. Adicionalmente, las glicoproteínas ricas en manosa se espera que sean más inmunogénicas. En consecuencia, es deseable producir glicoproteínas terapéuticas como, por ejemplo, anticuerpos terapéuticos, que tienen un contenido de manosa bajo.

5 Los presente inventores resuelven esta necesidad en la técnica proporcionando métodos para modular (por ejemplo, controlar o reducir) el contenido de manosa de proteínas y péptidos producidos recombinantemente.

### **Resumen de la invención**

10 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de factores que afectan al contenido de manosa y, en particular, al contenido de manosa alto, de glicoproteínas expresadas recombinantemente. La invención puede ser definida por las reivindicaciones añadidas.

15 Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método de reducir el contenido de manosa alto de glicoproteínas producidas recombinantemente de tal forma que menos de alrededor del 10% de las glicoproteínas en la composición tienen más de 4 residuos de manosa por oligosacárido N-ligado. El método comprende cultivar una célula huésped mamífera que expresa la proteína recombinante durante alrededor de 5 a 14 días en un medio de cultivo que tienen una osmolalidad de alrededor de 250 mOsm/Kg a alrededor de 600 mOsm/Kg, el medio de cultivo comprendiendo betaína a una concentración de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM, potasio a una concentración de alrededor de 10mM a alrededor de 70 mM, y sodio a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM.

20 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método de reducir el contenido de manosa (es decir, en una cadena lateral de oligosacárido) de una glicoproteína recombinante producida en una célula huésped mamífera manipulando las condiciones del cultivo celular de tal forma que la glicoproteína producida por la célula tenga contenido de manosa bajo. Como se usa en la presente, el término "contenido de manosa bajo" se refiere a composiciones de glicoproteínas en donde menos de alrededor del 10%, o menos de alrededor del 8%, o menos de alrededor del 5% (por ejemplo, alrededor del 4% o menos) de las glicoproteínas en la composición tengan más de 4 residuos de manosa (es decir, son especies de la M5 o mayor). Como se usa en la presente, el término "contenido de manosa bajo" también se refiere a composiciones de glicoproteínas en donde menos de alrededor del 10%, menos de alrededor del 9%, menos de alrededor del 8%, menos de alrededor del 7%, menos de alrededor del 6%, menos de alrededor del 5%, menos de alrededor del 4%, menos de alrededor del 3%, menos de alrededor del 2%, menos de alrededor del 1%, o cualquier valor entre cualquiera de estos intervalos precedentes, incluso cero.

35 El contenido de manosa bajo puede ser conseguido manteniendo el entorno del cultivo celular a osmolalidad baja (por ejemplo, menos de alrededor de 600 mOsm/Kg, o menos de alrededor de 500 mOsm/Kg, o menos de alrededor de 400 mOsm/Kg, por ejemplo, entre alrededor de 380 a 250 mOsm/Kg). Esto enriquece el cultivo celular para las glicoproteínas que tienen contenido de manosa bajo, es decir, que tienen 4 o menos residuos de manosa en las cadenas laterales de oligosacáridos de la glicoproteína.

40 Se divulga que los intervalos de osmolalidad precedentes se pueden conseguir manipulando un número de parámetros del cultivo celular incluyendo, pero no limitado a, concentraciones de una o más sales, vitaminas, azúcares, peptonas y aminoácidos en el medio de cultivo celular. En consecuencia, se divulga un método de producir una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de manosa bajo cultivando una célula huésped que expresa la glicoproteína en un medio que contiene potasio a una concentración de alrededor de 70 mM o menos (por ejemplo, de alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM); y/o sodio a una concentración de alrededor de 200 mM o menos (por ejemplo, de alrededor de 50 mM a alrededor de 100 mM) y mantener la osmolalidad del cultivo celular a alrededor de 600 mOsm/Kg o menos.

50 En todavía otra realización, esta invención proporciona el 5 250 mOsm/kg anterior a alrededor de método de producir una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de manosa bajo cultivando una célula huésped que expresa la glicoproteína en un medio que está sustancialmente libre de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo consistente de alanina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, y manteniendo la osmolalidad del cultivo celular en alrededor de 250 mOsm/kg a alrededor de 600 mOsm/kg.

55 Además, en todavía otra realización, el medio puede incluir una o más vitaminas seleccionadas del grupo consistente de biotina, pantotenato de D-calcio, cloruro de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, piridoxal HCl, piridoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl y cianocobalamina, a una concentración de alrededor de 0,00005 g/L a alrededor de 0,9 g/L. En todavía otra realización, el medio incluye glucosa a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 90 mM. En una realización adicional, el medio incluye una o más peptonas seleccionadas del grupo consistente de extracto de levadura, hidrolizado de levadura, peptona de soja, hidrolizado de soja, peptona de trigo e hidrolizado de trigo, a una concentración de alrededor de 0,5 g/L a alrededor de 60 g/L.

65 En todavía otra realización adicional de la presente invención, el medio del cultivo celular puede incluir al menos dos osmoprotectores en una cantidad necesaria para mantener la osmolalidad a un nivel deseado, por

ejemplo a 8 Un mamífero alrededor de 600 mOsm/kg. Los osmoprotectores adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, glicina, L-treonina y L-prolina, y derivados de los mismos como, por ejemplo betaína de glicina y aldehído de betaína. De acuerdo con los métodos de la invención la betaína osmoprotectora está presente a una concentración de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM en el medio del cultivo celular.

5 Parámetros del cultivo celular adicionales que pueden ser controlados, ya sea por sí solos o en combinación con uno o más de los parámetros descritos en la presente incluyen, por ejemplo, temperatura y duración del tiempo que las células son cultivadas. En ciertas realizaciones, una célula huésped que expresa una glicoproteína recombinante se cultiva a una temperatura de alrededor de 31° C a alrededor de 38° C. Una célula huésped mamífera que expresa una glicoproteína recombinante se cultiva por un periodo que varía de alrededor de 5 días a alrededor de 14 días.

10 Las células huésped adecuadas para expresar glicoproteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención son bien conocidas en la técnica e incluyen cualquiera de las descritas en la presente, como células CHO, células linfocíticas (por ejemplo células NSO) y una variedad de otras células mamíferas.

La presente invención puede ser empleada para producir una amplia variedad de glicoproteínas que tienen bajo contenido de manosa como se describe en la presente. En una realización particular, la invención se usa para producir un anticuerpo monoclonal recombinante o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo que tiene un contenido de manosa bajo. Los anticuerpos adecuados pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y completamente humanos, así como otras formas de anticuerpos conocidas en la técnica. En otra realización particular, el anticuerpo enlaza con el IL-15, que incluye pero no está limitada a los anticuerpos divulgados en la Publicación U.S. Nº 2003-013842. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método de reducir el contenido rico en manosa de anticuerpos producidos recombinantemente, o un fragmento que enlaza con el antígeno de los mismos, de tal forma que menos de alrededor del 10% de las glicoproteínas en la composición tengan más de 4 residuos de manosa por Oligosacárido N-ligado. El método comprende cultivar una célula huésped mamífera que expresa el anticuerpo recombinante o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo en un medio de cultivo que tiene una osmolalidad de alrededor de 250 mOsm/Kg a alrededor de 600 mOsm/Kg, el medio de cultivo comprendiendo betaína a una concentración de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM, potasio a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 70 mM y sodio a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM. El anticuerpo monoclonal humano recombinante, o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo monoclonal humano recombinante, o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, que enlaza con el IL-15, en donde el anticuerpo o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:4, o sustituciones de aminoácido conservadoras de la misma, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:2, o sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. Se divulga el método anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano que enlaza con el IL-15 que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:4 y/o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:2, así como secuencias homólogas que enlazan con el IL-15 (por ejemplo, tienen secuencias de aminoácido de alrededor del 80, 85, 90, 95% o mayor identidad con la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:2, respectivamente). También se divulga el método anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano que enlaza con el IL-15, o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, que tiene una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones determinantes complementarias (CDRs) expresadas en las SEQ ID NOS:8-10, así como secuencias homólogas que enlazan con el IL-15 (por ejemplo, tienen secuencias de aminoácido de alrededor del 80, 85, 90, 95% o mayor identidad con cualquiera de las SEQ ID NOS:8-10, respectivamente), y una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones determinantes complementarias (CDRs) expresadas en las SEQ ID NOS:5-7 así como secuencias homólogas que enlazan con el IL-15 (por ejemplo, tienen secuencias de aminoácido de alrededor del 80, 85, 90, 95% o mayor identidad con cualquiera de las SEQ ID NOS:5-7, respectivamente). Un anticuerpo monoclonal humano que enlaza con el IL-15 o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, puede incluir una región variable de cadena ligera que comprende las tres CDRs expresadas en las SEQ ID NOS:8-10, y una región variable de cadena pesada que comprende las tres CDRs expresadas en las SEQ ID NOS:5-7, o sustituciones de aminoácido conservadoras de las mismas.

55 Se divulgan glicoproteínas recombinantes que tienen contenido de manosa bajo producidas por los métodos descritos en la presente. En consecuencia, dichas glicoproteínas pueden incluir cualquiera de las glicoproteínas terapéuticas anteriormente mencionadas, como anticuerpos, hormonas, enzimas, péptidos y otras glicoproteínas.

60 También se divulgan composiciones que comprenden cualquiera de las glicoproteínas anteriormente mencionadas que tienen contenido de manosa bajo. La composición puede ser una composición farmacéutica que incluye una glicoproteína aislada (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano aislado que enlaza con el IL-15 o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo) que tiene un contenido de manosa bajo y un portador farmacéuticamente aceptable.

65

También se divulga un método de tratar o prevenir un desorden que está asociado con una sobreexpresión del IL-15 humana y/o en el que los efectos inducidos por una regulación a la baja o inhibición de la IL-1 humana son beneficiosos, administrando a un sujeto un anticuerpo del IL-15 aislado que tiene un contenido de manosa bajo. Desórdenes ejemplares incluyen, pero no están limitados a, vasculitis, psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca), rechazo de aloinjertos, enfermedad injerto contra huésped, linfoma de células T, y leucemia de células T.

Igualmente, se divulga un método de tratar o prevenir un desorden que está asociado con una sobreexpresión del IL-15 humana y/o en el que los efectos inducidos por una regulación a la baja o inhibición del IL-15 humana son beneficiosos, administrando a un sujeto un anticuerpo del IL-15 aislado que tiene un contenido de manosa bajo. Desórdenes ejemplares incluyen, pero no están limitados a, artritis, trastorno del tejido conectivo, desórdenes oftalmológicos, desórdenes neurológicos, desórdenes gastrointestinales y hepáticos, desórdenes alérgicos, desórdenes hematológicos, desórdenes de la piel, desórdenes pulmonares, tumores malignos, desórdenes derivados de trasplantes, desórdenes endocrinológicos, desórdenes vasculares, desórdenes ginecológicos y enfermedades infecciosas.

### **Breve Descripción de los Dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que recoge la correlación entre la osmolalidad y el rico contenido de manosa de un anticuerpo monoclonal completamente humano que enlaza con la IL-15 producido cultivando células que expresan el anticuerpo en agitado r de control (50 mL9 y biorreactores (150 L y 500 L).

La Figura 2 es un gráfico que recoge la correlación entre la adición de un osmoprotector, betaína, y el contenido rico en manosa de un anticuerpo monoclonal completamente humano que enlaza con la IL-15.

La Figura 3 es un gráfico que recoge la correlación entre la osmolalidad y la concentración de K<sup>+</sup> del medio de cultivo.

La Figura 4 es un gráfico que recoge la correlación entre el contenido rico en manosa de de un anticuerpo monoclonal completamente humano que enlaza con la IL-15 y la osmolalidad, cultivando células en un medio que contiene o 15 mM o 45 mM de KCl.

La Figura 5 es una representación gráfica de la correlación entre la concentración de K<sup>+</sup> y el contenido rico en manosa, mostrando que la concentración óptima de K<sup>+</sup> para mantener el contenido rico de manosa por debajo del 10% está entre alrededor de 0 y alrededor de 70 mM.

La Figura 6 es un gráfico que representa la correlación entre la concentración de Na<sup>+</sup> y el contenido rico en manosa, mostrando que la concentración óptima de Na<sup>+</sup> para mantener el contenido rico de manosa por debajo del 10% está entre alrededor de 0 y alrededor de 200 mM.

La Figura 7 es un gráfico que recoge la correlación entre la concentración de aminoácidos y el contenido rico en manosa.

La Figura 8 es un gráfico que recoge la correlación entre el tipo de medio de alimentación usado y el contenido rico en manosa.

### **Descripción Detallada de la Invención**

En consecuencia, es deseable producir glicoproteínas terapéuticas como, por ejemplo, anticuerpos terapéuticos, que tienen un contenido de manosa bajo.

Para que a la presente divulgación pueda ser entendida más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

#### **I. Definiciones**

Las porciones de carbohidratos se describen en la presente con referencia a la nomenclatura comúnmente usada para los oligosacáridos. Una reseña de química de carbohidratos que usa esta nomenclatura se puede encontrar, por ejemplo, en Hubbard e Ivatt, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583 (1981). Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa a la manosa; GlcNAc, que representa a la 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa a la galactosa; y Glc, que representa a la glucosa. Los ácidos siálicos se describen con referencia a la notación abreviada NeuNAc, para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para el ácido 5-glicolilneuramínico.

El término "osmolalidad", como se usa en la presente, se refiere a una medición de la presión osmótica de partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (es decir,

osmoles) disueltas en 1 kg de solución (1 mOsm/kg H<sub>2</sub>O a 38° C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm Hg. Como se usa en la presente, la abreviación "mOsm" significa "miliosmoles/kg de solución". La osmolalidad del medio de cultivo celular se puede mantener a alrededor de 600 mOsm/Kg o menos, o a alrededor de 550 mOsm/kg o menos, o a alrededor de 500 mOsm/kg o menos, o a alrededor de 450 mOsm/kg o menos, o a alrededor de 400 mOsm/kg o menos, o a alrededor de 380 mOsm/kg o menos, o entre alrededor de 200 mOsm/Kg y alrededor de 600 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 550 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 500 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 450 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 400 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 380 mOsm/kg, o entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 350 mOsm/kg.

Como se usa en la presente, el término "glicoproteína" se refiere a péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos, que tienen al menos una cadena lateral de oligosacárido que incluye residuos de manosa. Las glicoproteínas pueden ser homólogas a la célula huésped, o pueden ser heterólogas, por ejemplo, extrañas, a la célula huésped que se está utilizando, como, por ejemplo, una glicoproteína humana producida por una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO). A dichas glicoproteínas se hace referencia generalmente como "glicoproteínas recombinantes". En ciertas realizaciones, las glicoproteínas expresadas por la célula huésped son secretadas directamente en el medio. Ejemplos de glicoproteínas mamíferas incluyen las siguientes moléculas y anticuerpos contra las mismas, citocinas, por ejemplo, IL-1 a IL-15, y sus receptores, quimiocinas, como la TNF, TECK, y sus receptores, por ejemplo, TNFRs, CCR9, hormonas de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana, y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación como el factor VIIIc, factor IX, factor de tejido, y el factor de von Willebrands, factores anticoagulantes como la Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activador plasminógeno, como la uroquinasa u orina humana o activador plasminógeno de tipo tejido (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hemopoyético; encefalina; RANTES (regulado en la activación normalmente de células T expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); albúmina de suero como la albúmina de suero humana; sustancia inhibidora de la mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; protelaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, como la betalactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; intergrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina- 3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6),, o un factor de crecimiento nervioso como la NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos como la aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) como el TGF-alfa y el TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, o TGF-beta5; factor de crecimiento similar a la insulina -I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas que enlazan con el factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD como las CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina, factores osteoinductivos; inmunotoxinas; proteína morfogénica del hueso (BMP); interferones como el interferón -alfa, -beta, y -gamma; factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-15; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de la membrana de superficie; factor acelerador de la descomposición; antígenos virales como, por ejemplo, una parte de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores homing; y proteínas regulatorias.

Como se usa en la presente, los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" se refieren a una solución nutriente usada para cultivar células mamíferas que típicamente proporcionan al menos un componente de una o más de las siguientes categorías: 1) una fuente de energía, habitualmente en la forma de un carbohidrato como, por ejemplo, glucosa; 2) uno o más de todos los aminoácidos esenciales, y habitualmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína; 3) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos requeridos a concentraciones bajas; 4) ácidos grasos libres; y 5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos que tienen lugar de forma natural que se requieren típicamente a muy bajas concentraciones, habitualmente en el intervalo micromolar. La solución nutriente puede estar opcionalmente suplementada con componentes adicionales para optimizar el crecimiento de las células.

El cultivo de células mamíferas de la presente invención se prepara en un medio adecuado para la célula particular que está siendo cultivada. El medio de cultivo celular adecuado que puede ser usado para cultivar un tipo de célula particular será aparente para alguien experto en la técnica. Medios comercialmente disponibles ejemplares incluyen, por ejemplo, Ham's F10 (SIGMA), Medio Esencial Mínimo (MEM, SIGMA), RPMI-1640 (SIGMA), y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, SIGMA). Cualquiera de estos u otros medios pueden ser suplementados como sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), reguladores (como el HEPES), nucleósidos (como la adenosina y la timidina), antibióticos (como la Gentamy-cin<sup>TM</sup>), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), lípidos (como el linoleico u otros ácidos grasos) y sus portadores adecuados, y glucosa o una fuente de energía equivalente, y/o modificados como se describe en la presente para facilitar la producción de glicoproteínas recombinantes que tienen un contenido de manos abajo. El medio de cultivo celular está libre de suero.

En ciertas realizaciones, un medio de cultivo celular puede ser optimizado para reducir el contenido rico de manosa de una glicoproteína recombinante expresado por un célula huésped cultivada en dicho medio. En una realización particular, la célula huésped mamífera es una célula CHO y un medio adecuado contiene un componente de medio basal como una formulación basada en DMEM/HAM F-12 con concentraciones modificadas de uno o más componentes como, por ejemplo, aminoácidos, sales, azúcares, peptonas y vitaminas, para modular (por ejemplo, reducir) el contenido rico en manosa de una glicoproteína recombinante expresada por una célula CHO cultivada en dicho medio.

El término "fase de crecimiento" de un cultivo celular se refiere al periodo de crecimiento celular exponencial (es decir, fase logarítmica) donde las células generalmente se dividen rápidamente. Las células son mantenidas en la fase de crecimiento durante un periodo de alrededor de un día, o alrededor de dos días, o alrededor de tres días, o alrededor de cuatro días, o más tiempo que cuatro días. La duración del tiempo durante el que las células se mantienen en la fase de crecimiento variará en base al tipo de célula y la tasa de crecimiento de las células y las condiciones del cultivo, por ejemplo.

El término "fase de transición" se refiere a un periodo de tiempo entre la fase de crecimiento y la fase de producción. Generalmente, la fase de transición es el tiempo durante el que las condiciones de cultivo pueden ser controladas para respaldar un cambio de la fase de crecimiento a la fase de producción. Varios parámetros del cultivo celular que pueden ser controlados incluyen pero no están limitados a , uno o más de, temperatura, osmolalidad, vitaminas, aminoácidos, azúcares, peptonas, amonio y sales.

El término "fase de producción" de un cultivo celular se refiere al periodo de tiempo donde el crecimiento celular se ha estabilizado. El crecimiento celular logarítmico típicamente finaliza antes o durante esta fase y la producción de proteínas toma el relevo. Es deseable suplementar el medio de cultivo celular para conseguir la producción de proteínas deseada en esta etapa.

Los términos "célula huésped mamífera" y "célula mamífera" se refieren a líneas celulares derivadas de mamíferos que son capaces de crecer y sobrevivir cuando se colocan o en un cultivo monocapa o en un cultivo en suspensión en un medio que contiene los nutrientes y factores de crecimiento apropiados. Típicamente, dichas células son capaces de expresa y secretar grandes cantidades de una glicoproteína particular de interés en el medio de cultivo. Ejemplos de células huésped mamíferas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células de ovario de hámster Chino/- DHFR (Urluab y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células dpl2CHO (EP 307247); CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión) (Graham y otros, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4) (Mather, Bibl. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76) (ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humanas (HeLa) (ATCC CCL 2); células re riñón humanas (MDCK) (ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A) (ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138) (ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2 HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); Células TRI (Mather y otros, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:4-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humana (Hep G2).

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente, se pretende que se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que dichos términos se pretende que se refieran no solo a la célula sujeto particular sino también a la progenie de dicha célula. Como pueden tener lugar ciertas modificaciones en las generaciones subsiguientes debido o a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero están todavía incluidas dentro del ámbito del término "célula huésped" como se usa en la presente.

Los términos "expresión", "expresar" y "expresa" se refieren de forma general a la transcripción y la traducción que tienen lugar dentro de una célula huésped. El nivel de expresión del producto del gen en una célula huésped puede ser determinado en base o de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula o de la cantidad de proteína codificada por el gen. Por ejemplo, el ARNm transcrito de un gen del producto puede ser cuantificado por hibridación northern. (Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 7...-7.57, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Una proteína codificada por un gen puede ser cuantificada o por ensayo de la actividad biológica de la proteína o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, como, por ejemplo, análisis western blot o radioinmunoensayo usando anticuerpos que son capaces de reaccionar con la proteína. (Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 18.1-18.88 Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). En algunas realizaciones, los términos "expresión", "expresar" y "expresa" se usan en referencia a una proteína recombinante que tiene bajo contenido de manosa producida por un método de la invención.

Los términos "manosa baja" y "contenido de manosa bajo" como se usan en la presente, se refieren a composiciones de glicoproteínas, donde alrededor del 10% de la composición comprende glicoproteínas que tienen más de 4 residuos de manosa, es decir, especie M5 o mayor. A la inversa, "contenido rico en manosa" se refiere a una composición de glicoproteínas donde más de alrededor del 10% de la composición comprende glicoproteínas que tienen más de 4 residuos de manosa. Los términos "manosa baja" y "contenido de manosa bajo", también son

usados en referencia a una composición de glicoproteína que incluye más de alrededor del 90%, o más de alrededor del 95% de la composición teniendo glicoproteínas que incluyen 4 o menos de 4 residuos de manosa.

5 El término "una glicoproteína que tiene un contenido de manosa bajo" se usa en referencia a una composición de glicoproteína recombinante", que cuando se produce cultivando una célula huésped, incluye, pero no está limitada a los mismos, no más de alrededor del 4%, no más de alrededor del 5%, no más de entre alrededor del 4% y alrededor del 5%, no más de alrededor del 6%, no más de entre alrededor del 5% y el 6%, no más de alrededor del 7%, no más de entre alrededor del 6% y el 7%, no más de alrededor del 8%, no más de alrededor del 7% u el 8%, no más de alrededor del 9%, no más de entre el 8% y el 9%, no más de alrededor del 10%, o no más de  
10 entre alrededor del 9% y el 10% de las glicoproteínas en la composición teniendo más de 4 residuos de manosa (es decir, especie M5 o mayor. En consecuencia, el término "una glicoproteína que tiene un contenido de manosa bajo" se refiere a una composición de glicoproteína recombinante, que cuando se produce cultivando una célula huésped, incluye más de alrededor del 90%, o más de alrededor del 95%, de las glicoproteínas en la composición teniendo 4 o  
15 menos de 4 residuos de manosa (es decir, 0-4 residuos de manosa).

El contenido de manosa alto puede ser medido por uno o más métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Wuhrer y otros (Journal of Chromatography B Vol. 825:124-133, 2005) y Dell y otros (Science Vol. 291: 2351-2356), y los descritos en la presente incluyendo, por ejemplo, el método analítico para el mapeado del N-Glicano de glicoproteínas. Brevemente, los N-glicanos son retirados enzimáticamente de las  
20 glicoproteínas recombinantes, como un anticuerpo monoclonal recombinante, y etiquetados con una etiqueta fluorescente (2-Aminobenzamida) en la terminal reductora. Los N-glicanos fluorescentes son separados por cromatografía de intercambio de aniones de pH alto (HPAEC), y detectados usando detección de fluorescencia. La separación de los N-glicanos neutrales se basa generalmente en la complejidad creciente en las estructuras del N-glicano. La separación de los N-glicanos cargados se basa en el número y tipo de ácido siálico, sulfato, u otras  
25 modificaciones presente de las que se pueden derivar un número de carga. Estos perfiles de glicano de las muestras de prueba se comparan visualmente con un estándar apropiado.

El contenido rico en manosa puede ser también medido un método revelado inmediatamente en la presente: un método de alto rendimiento para detectar y/o cuantificar el contenido rico en manosa de una  
30 glicoproteína, incluyendo pero no limitado a, anticuerpos o fragmentos de los mismos, por ejemplo fragmentos Fab, proteínas de fusión que comprenden fragmentos Fc y peptidocuerpos cuando se expresan en células huésped eucariotas. Los anticuerpos típicamente tienen un único glicano N-ligado en la región Fc. Debido a la estructura parcialmente enterrada del glicano, a menudo sólo se procesa parcialmente, resultando en un exceso de manosa y selección de clones de tipos híbridos-, mutación de células u otra manipulación genética, o la manipulación del cultivo celular puede alterar los tipos de glicanos producidos por las células. Se exploran grandes números de  
35 condiciones/células en consecuencia se requieren muchas pruebas de glicanos durante la selección. El mapeado de glicanos tradicional es lento y de trabajo intensivo, requiriendo múltiples días. El ensayo de glicano rico en manosa/híbrido de la presente invención proporciona tasas de tipos de glicanos más rápidamente con mucho menos esfuerzo del operador.

40 Un método para detectar y/o cuantificar el contenido rico en manosa de una glicoproteína en una muestra o una composición que comprende la mencionada glicoproteína, dicho método comprende someter a la muestra o la composición que comprende la glicoproteína a una digestión con endoglicosidasa, reduciendo las glicoproteínas digeridas usando un agente reductor (si se requiere), y separando las glicoproteínas digeridas por electroforesis de  
45 desnaturalización por lo que la tasa de glicanos ricos en manosa/tipo híbrido se determina sustrayendo la fracción de la cadena pesada no glicosilada (fracción del máximo sin el tratamiento con endoglicosidasa) de la fracción de la cadena pesada deglicosilada (máximo después de la digestión con endoglicosidasa). La fracción de la cadena pesada no glicosilada o la fracción máxima sin tratamiento con endoglicosidasa se genera sometiendo la misma muestra o composición a la misma condición de digestión excepto que no hay presente endoglicosidasa en la  
50 misma. Este paso se puede llevar a cabo concurrentemente con o separadamente del paso de digestión con endoglicosidasa.

Cualquier endoglicosidasa que escinde selectivamente los glicanos ricos en manosa e híbridos entre el  
55 GlcNAc1 y el GlcNAc2 en el glicano central (o generando glicanos cortos en la proteína), mientras se dejan los glicanos N-ligados complejos intactos puede ser usada en esta invención. Para la cuantificación apropiada, la endoglicosidasa no debe estar en cantidades limitativas. La condición específica para llevar a cabo la digestión con endoglicosidasa, incluyendo la concentración del enzima, la temperatura de incubación y el tiempo de digestión, depende del tipo de endoglicosidasa utilizado. Ejemplos de endoglicosidasas relacionadas con la invención incluyen pero no están limitadas a, Endoglicosidasa H y Endoglicosidasa F1. En una realización de la presente invención, la  
60 muestra que comprende las glicoproteínas se trata con Endoglicosidasa H a 37° C durante alrededor de 2 horas, reducida con p-mercaptoetanol, y sometida a análisis CE-SDS.

Métodos ejemplares para separar las glicoproteínas dc-glicosiladas, por ejemplo, anticuerpo de-glicosilado, de las glicoproteínas glicosiladas, por ejemplo, anticuerpo glicosilado, incluyen pero no están limitados a los  
65 siguientes dos métodos:

1) CE-SDS bajo condiciones reductoras. La glicoproteína glicosilada, por ejemplo, un anticuerpo, se desnaturaliza con SDS y un agente reductor y la cadena pesada (HC) de la misma con el glicano se separa de la HC escindida (HC deglicosilada) por Electroforesis Capilar-SDS (CFrSDS). Se genera un electroferograma de la señal UV. Las áreas bajo los máximos son proporcionales a las cantidades relativas. Por lo tanto la cantidad del tipo Rico en manosa/híbrido se determina de la fracción eluyendo en la posición anterior de la HC deglicosilada. Como la GlcNAc-HC coemigra con la HC deglicosilada, el % de HC deglicosilada de la muestra no digerida es sustraída del pre-máximo de una muestra digerida para ofrecer el % del valor rico en manosa. La separación requiere 15-30 minutos, dependiendo de la configuración.

2) CE-SDS basado en Microfluidos. La glicoproteína es desnaturalizada como en 1) pero separada usando un instrumento de "laboratorio en un chip", como el LC90 de Caliper. El mismo principio se usa en el ensayo y la separación, aunque de usa un tinte fluorescente para detectar la proteína. El tiempo de separación se reduce a alrededor de 30 segundos por ensayo y puede ser hecho un muestreo de una placa de micropocillos.

El método como se ha descrito anteriormente puede ser realizado en proteína purificada pero también en muestras de cultivo celular en bruto. Con anticuerpos recombinantes, la señal es lo suficientemente fuerte para que no se requiera la purificación.

En ciertas realizaciones, las glicoproteínas que tienen más de 4 residuos de manosa incluyen glicoproteínas que tienen de 5 a 9residuo de manosa (es decir, especie M5-M9). Sin desear estar ligados a ninguna teoría en particular, alguien experto en la materia entenderá que una composición de glicoproteínas expresada por una célula huésped incluye glicoproteínas con un número variante de residuos de manosa. Por ejemplo, las glicoproteínas bajas en manosa tienen 4 o menos de 4 residuos de manosa (por ejemplo, 0-4 residuos de manosa); y las glicoproteínas ricas en manosa tienen más de 4 residuos de manosa (por ejemplo, especie M5 o mayor).

En una realización particular de la invención, una glicoproteína que tiene un contenido de manosa bajo es un anticuerpo recombinante o un fragmento que enlaza al antígeno del mismo. En otra realización particular de la invención, una glicoproteína recombinante que tiene un contenido bajo de manosa es un anticuerpo monoclonal humano que enlaza con el IL-15 o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo.

El término "sustancialmente libre", como se usa en la presente, se refiere generalmente a preparaciones de un medio de cultivo celular que está libre o tiene una cantidad reducida (es decir, en relación al medio de cultivo no modificado) de ciertos componentes. Por ejemplo, en una realización, el medio de cultivo usado para producir glicoproteínas recombinantes que tienen un contenido de manosa bajo está sustancialmente libre de ciertos aminoácidos (por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados del grupo consistente de alanina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico). En algunas realizaciones, un medio de cultivo sustancialmente libre de uno o más componentes se modifica para incluir menos de alrededor de un 1%, o menos de alrededor de un 3%, o menos de alrededor de un 5%, o menos de alrededor de un 10% de uno o más de dichos componentes en relación al medio de cultivo no modificado.

Los términos "IL-15", "antígeno IL-15" e interleucina 15" se usan intercambiamente en la presente, e incluyen cualquier variante o isoforma que sea expresada de forma natural por las células.

El término "anticuerpo" como se hace referencia en la presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento que enlaza con el antígeno (es decir, "parte que enlaza con el antígeno") o cadena simple del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende las menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una parte que enlaza con el antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden ser además subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes complementarias (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas de términos amino a términos carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina con tejidos o factores huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema complementario clásico.

Los términos "parte que enlaza con el antígeno" y "fragmento que enlaza con el antígeno" de una anticuerpo (o simplemente "parte del anticuerpo"), como se usan en la presente, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que enlazan selectivamente con un antígeno (por ejemplo, IL-15). Se ha demostrado que la función de enlace con antígenos de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos que enlazan con antígenos englobados dentro del término "parte que enlaza con el antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por

un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V<sub>H</sub> y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, Nature 341:544-546 (1989)), que consiste de un dominio V<sub>H</sub>; y (vi) una región determinante complementaria aislada (CDR) o (vii) una combinación de dos o más CDRs aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> están codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite ser hechos como una única cadena de proteínas en la que el par de regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv)); ver por ejemplo, Bird y otros Science 242:423-426 (1988); y Huston y otros Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:58795883 (1988). Dichos anticuerpos de cadena única se pretende también que estén englobados dentro de los términos "parte que enlaza con el antígeno" y "fragmento que enlaza con el antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos son seleccionados por utilidad de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad y afinidad de enlace para un epítipo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humanos" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de enlace y que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de una animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de la cadena pesada humano y un transgen de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de un biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinacional, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por otros medios que implican el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humanas a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de la inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras están derivadas y relacionadas con las secuencias de las V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación al organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante que corresponde con la encontrada en un organismo que no consiste del animal no humano transgénico, y generalmente de una especie que no es la del animal no humano transgénico.

Un "anticuerpo aislado" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que enlaza específicamente con el IL-15 está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente enlazan con antígenos que no sean el IL-15). Un anticuerpo aislado que enlaza específicamente con un epítipo del IL-15 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras citocinas relacionadas u otras proteínas del IL-15 de especies diferentes. Sin embargo, el anticuerpo preferiblemente siempre enlaza con el IL-15 humana. Además, un anticuerpo aislado está típicamente sustancialmente libre de otro material y/o químicos celulares. En una realización particular, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades con el IL-15 se combinan en una composición bien definida.

Como se usa en la presente, "enlace específico", "enlace selectivo" y "enlaza selectivamente" se refieren a un anticuerpo o un fragmento del mismo, que enlaza con un antígeno predeterminado. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo enlaza con una afinidad (K<sub>D</sub>) de aproximadamente menos de 10<sup>-7</sup> M, como aproximadamente menos de 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M o 10<sup>-10</sup> M o incluso más baja cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmones de superficie (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando IL-15 humana recombinante como el analito y el anticuerpo como el ligando, y enlaza con el antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces más grande que su afinidad para enlazar con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce a un antígeno" y "un anticuerpo específico par aun antígeno" se usan intercambiamente en la presente con el término "un anticuerpo que selectivamente enlaza con un antígeno".

El término "K<sub>D</sub>" como se usa en la presente, se pretende que se refiera a una constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo "por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada.

5 Como se usa en la presente, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el que la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

10 Como se usa en la presente, "isotipo no cambiado" se refiere a la clase isotípica de la cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar cambio de isotipo; el gen CH que codifica al isotipo no cambiado es típicamente el primer gen CH inmediatamente secuencia abajo del gen VDJ reordenado funcionalmente. El cambio de isotipo ha sido clasificado como cambio de isotipo clásico o no clásico. El cambio de isotipo clásico tiene lugar por eventos de recombinación que implican al menos un cambio de región de secuencia en el transgen. El cambio de isotipo no clásico puede tener lugar por, por ejemplo, recombinación homóloga entre la  $\sigma_{\mu}$  humana y la  $\Sigma_{\mu}$  humana (delección  $\delta$ -asociada). Pueden tener lugar mecanismos de cambio no clásicos alternativos, como la recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, y efectuar el cambio de isotipo.

15 Como se usa en la presente, el término "secuencia de cambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia "donante del cambio", típicamente una región de cambio  $\mu$ , será 5' (es decir, secuencia arriba) de la región del constructo a ser eliminada durante la recombinación de cambio. La región "aceptadora de cambio" estará entre la región del constructo a ser eliminada y la región constante de reemplazo (es decir,  $\gamma$ , e, etc.). Como no hay sitio específico donde tiene lugar siempre al recombinación, la secuencia del gen final no será típicamente predecible del constructo.

20 Como se usa en la presente, "patrón de glicosilación" se define como el patrón de unidades de carbohidratos que están unidas covalentemente a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede ser caracterizado como siendo sustancialmente similar a los patrones de glicosilación que tienen lugar de forma natural en anticuerpos producidos por las especie de animal transgénico no humano, cuando alguien experto en la materia reconocerá el patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo como siendo más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie de animal transgénico no humano que a la especie de la que se derivaron los genes CH del transgen.

25 El término "que tiene lugar de forma natural" como se usa en la presente aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio tienen lugar de forma natural.

30 El término "reorganizado" como se usa en la presente se refiere a una configuración de locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en donde un segmento V está posicionado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio  $V_H$  o  $V_L$  completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reorganizado puede ser identificado por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

35 El término "no reorganizado" o "configuración de línea germinal" como se usa en la presente en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en donde el segmento V no está recombinado para estar inmediatamente adyacente al segmento D o J.

40 El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a moléculas de ADN y ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

45 El término "molécula de ácido nucleico aislada" como se usa en la presente en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpos (por ejemplo,  $V_H$ ,  $V_L$ , CDR3) que enlazan selectivamente con el IL-15, se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o la parte de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo que enlazan con antígenos que no sean el IL-15, cuyas otras secuencias pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Las SEQ ID NOS: 1-4 corresponden con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que comprenden las regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la cadena ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo anti-IL-15 humano. En particular, las SEQ ID NO:1 y 2 corresponden con la  $V_H$  del anticuerpo y las SEQ ID NO:3 y 4 corresponden con la  $V_L$  del anticuerpo.

50 El anticuerpo monoclonal humano que enlaza con el IL-15, o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, incluye una región variable de cadena ligera que comprende una o más y preferiblemente las tres CDRs expresadas en las SEQ ID NOS:8-10 y una región variable de cadena pesada que comprende una o más y preferiblemente las tres CDRs expresadas en las SEQ ID NOS:5-7.

También se divulgan "modificaciones de secuencia conservadoras" o "sustituciones de secuencia conservadoras" de las secuencias expresadas en las SEQ ID NOs:1-10, es decir modificaciones de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de enlace del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Las modificaciones pueden ser introducidas en las SEQ ID NOs:1-10 por técnicas estándar conocidas en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales betaramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IL-15 humano es preferiblemente reemplazado con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

Alternativamente las mutaciones pueden ser introducidas aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia que codifica el anticuerpo anti-IL-15, como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-IL-15 modificados pueden ser seleccionados para la actividad de enlace.

Por consiguiente, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótido (región variable de cadena pesada y ligera) divulgadas en la presente y/o que contienen las secuencias de aminoácidos (región variable de cadena pesada y ligera) divulgadas en la presente (es decir, SEQ ID NOs: 1-4) incluyen anticuerpos sustancialmente similares codificados por o que contienen secuencias similares que han sido modificadas conservadoramente. Además, se proporciona a continuación el análisis de cómo se pueden generar dichos anticuerpos sustancialmente similares en base a las secuencias parciales (es decir, regiones variables de cadena pesada y ligera) divulgadas en la presente como SEQ ID Nos:1-4.

Para los ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idéntico, con las inserciones o deleciones de nucleótidos adecuadas, en al menos alrededor de un 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos de alrededor del 90% a alrededor del 95%, y más preferiblemente al menos alrededor del 98% al 99,5% de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos hibridizan bajo condiciones de hibridación selectivas, al complemento de la cadena.

Para las secuencias de aminoácidos, el término "homología" indica el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos cuando se alinean y comparan óptimamente con las inserciones o deleciones apropiadas.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden conseguir usando algoritmos matemáticos.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacios de 40, 50, 60, 70 ó 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede ser también determinado usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando un atabla de residuos de peso PAM 120, una penalización de la longitud del espacio de 12 y una penalización del espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado usando el algoritmo de Needleman y Wunsch /J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando o una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso del espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención pueden ser usadas además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul y otros J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990). Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con espacios para propósitos de

comparación, se puede usar el BLAST con espacios como se describe en Altschul y otros, Nucleic ACids Res. 25(17):3389-3402 (1997). Cuando se utilizan programas de BLAST y BLAST con espacios, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLASST). (Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en una célula lisada, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o es "sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos i proteínas celulares., por técnicas estándar, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, bandas CsCL, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Ver, F. Ausubel y otros, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

10 Las composiciones de ácido nucleico, mientras que a menudo pueden ser mutadas en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), de o ADNc, genómica o mezclas de los mismos, de acuerdo con las técnicas estándar para proporcionar secuencias de gen. Para secuencias de codificación, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácido como se desee. En particular, las secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de constante V, D, J nativa, cambian y se contemplan otras de tales secuencias descritas en la presente (donde "derivado" indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

15 Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, ligado operativamente significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, donde es necesario unir dos regiones que codifican proteínas, contiguas en un marco de lectura. Para secuencias de cambio, ligado operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de cambio.

20 El término "vector", como se usa en la presente, se pretende que se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen origen bacteriano de replicación y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped en el momento de la introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Dichos vectores se refieren en la presente como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende que la presente invención incluya las mencionadas otras formas de vectores de expresión, como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

30 Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. Se divulga que los métodos y composiciones se pueden usar para tratar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ovejas, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.

35 En las siguientes subsecciones se describen varios aspectos de la invención en más detalle.

## 50 **II. Factores que Afectan al Contenido de Manosa**

### (a) Osmolalidad

55 Varios parámetros del cultivo celular pueden afectar al contenido de manosa de una glicoproteína recombinante expresada en el cultivo celular mamífero. En particular, se descubrió a través de la presente invención que cuanto más alta es la osmolalidad del medio de cultivo celular, más alto es el porcentaje de glicoproteínas en la composición que tiene más de 4 residuos de manosa (es decir especie M5 o mayor). En consecuencia, en la presente invención, la osmolalidad del medio de cultivo celular se mantiene de alrededor de 250 mOsm/Kg a alrededor de 600 mOsm/Kg para reducir o controlar el contenido de manosa de las glicoproteínas expresadas.

60 Para el cultivo celular mamífero, la osmolalidad del medio de cultivo celular se mantiene a menos de alrededor de 550 mOsm/Kg, o a menos de alrededor de 500 mOsm/Kg, o a menos de alrededor de 450 mOsm/Kg, o a menos de alrededor de 400 mOsm/Kg, o a menos de alrededor de 380 mOsm/Kg, o a entre alrededor de 200 mOsm/Kg y alrededor de 600 mOsm/Kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 550 mOsm/Kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 500 mOsm/Kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de

450 mOsm/kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 400 mOsm/kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 380 mOsm/kg, o a entre alrededor de 250 mOsm/Kg y alrededor de 350 mOsm/kg.

5 Para conseguir una osmolalidad en el intervalo deseado, se puede ajustar la concentración de varios  
constituyentes en el medio de cultivo. Por ejemplo, solutos que pueden ser añadidos al medio de cultivo para  
aumentar la osmolalidad del mismo incluyen, proteínas, péptidos, aminoácidos, proteínas animales hidrolizadas  
como peptona, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, sales, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos,  
lípidos, y similares. Se apreciará sin embargo, que la(s) concentración(es) de otros constituyentes en el medio de  
cultivo pueden ser modificadas para conseguir una osmolalidad deseada.

10 La osmolaridad puede ser ajustada a los intervalos mencionados añadiendo uno o más osmoprotectores al  
medio de cultivo. Son bien conocidos osmoprotectores ejemplares en la técnica e incluyen, pero no están limitados  
a, betaína, glicina, L-treonina, L-prolina y derivados de los mismos incluyendo, pero no limitado a, betaína de glicina,  
aldehído de betaína. En el método de la invención, un medio de cultivo celular contiene betaína a una concentración  
de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM.

15 La osmolalidad puede ser medida por cualquiera de los medios que son bien conocidos en la técnica y los  
descritos en la presente. Por ejemplo, se puede usar un osmómetro como el que vende Fisher Scientific, Pittsburgh,  
PA bajo el nombre comercial OSMETTE para medir la osmolalidad de un medio de cultivo celular. Alternativamente,  
se puede usar el Osmette model 2007 (Precision Systems, Inc., Natick, MA).

20 La osmolaridad puede ser ajustada modificando la concentración de una o más de las sales, azúcares,  
peptonas, aminoácidos y amonio en el medio de cultivo celular.

25 Los parámetros anteriormente mencionados que afectan a la osmolalidad pueden ser combinados con  
manipular la temperatura y la duración del tiempo que las células son cultivadas para modular (por ejemplo, reducir)  
el contenido de manosa. En consecuencia, se debe entender que los varios parámetros de cultivo celular descritos  
en la presente pueden ser ajustados solos o en combinación para modular el contenido de manosa de las  
glicoproteínas recombinantes.

30 **(i) Concentraciones de Potasio y Sodio**

35 En los experimentos que condujeron a la presente invención, se demostró que un aumento en la  
concentración de potasio (K<sup>+</sup>) en el medio de cultivo contribuye al contenido rico en manosa de las glicoproteínas.  
En consecuencia, la invención emplea un medio de cultivo celular que tienen un concentración de K<sup>+</sup> de alrededor  
de 10mM a alrededor de 70mM.

40 Como se ha comentado anteriormente, se puede controlar sola la concentración de potasio del medio de  
cultivo celular, o se puede controlar en combinación con uno o más de los otros factores descritos en la presente que  
afectan a la osmolalidad. El medio de cultivo además incluye una concentración de sodio de alrededor de 50 mM a  
alrededor de 200 mM.

45 **(ii) Aminoácidos**

Otros factores que se descubrió que afectaban a la osmolalidad del medio de cultivo celular y/o contribuían  
al contenido rico en manosa de las proteínas expresadas recombinantemente son la concentración y el tipo de  
aminoácidos en el medio. Por ejemplo, una duplicación de la concentración de todos los 20 aminoácidos en el  
medio resulta en un aumento en el contenido de manosa. En consecuencia, el medio de cultivo celular puede ser  
ajustado para tener una concentración de aminoácidos reducida. En un medio particular, la concentración de  
aminoácidos se reduce a alrededor de la mitad.

50 En otra realización particular, el medio de cultivo celular está sustancialmente libre de uno o más  
aminoácidos seleccionados del grupo consistente de alanina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico.

55 **(iii) Azúcares**

Otros factores que se descubrió que afectaban a la osmolalidad del medio de cultivo celular y/o contribuían  
al contenido rico en manosa de las proteínas expresadas recombinantemente son la concentración y el tipo de  
azúcares en el medio. En una realización particular, el medio de cultivo celular incluye glucosa a una concentración  
de alrededor de 1 mM a alrededor de 90 mM.

60 **(iv) Amonio**

Otro factor que puede afectar a la osmolalidad del medio de cultivo celular y/o contribuye al contenido rico  
en manosa de las proteínas expresadas recombinantemente es la concentración de amonio de alrededor de 30 mM

o menos (por ejemplo, a alrededor de 0 mM a alrededor de 10 mM). La concentración de amonio puede ser de alrededor de 10 mM o menos.

**(v) Peptonas**

Otros factores que se descubrió que afectan a la osmolalidad del medio de cultivo celular y/o contribuyen al contenido rico en manosa de las proteínas expresadas recombinantemente son la concentración y el tipo de peptonas usadas en el medio. Las peptonas son suplementos de medio que se producen de proteínas animales hidrolizadas. Las fuentes de las peptonas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, subproductos animales, gelatinas y materiales vegetales. Peptonas ejemplares incluyen, pero no están limitadas a , extracto de levadura, hidrolizado de levadura, peptona de soja, hidrolizado de soja, peptona de trigo, e hidrolizado de trigo, a una concentración de alrededor de 0,5 g/L a alrededor de 60 g/L.

**(vi) Vitaminas**

Otros factores que se descubrió que afectan a la osmolalidad del medio de cultivo celular y/o contribuyen al contenido rico en manosa de las proteínas expresadas recombinantemente son la concentración y el tipo de vitaminas usadas en el medio. En una realización particular, el medio de cultivo celular incluye una o más vitaminas seleccionadas del grupo consiste de biotína, pantotenato de calcio-D, cloruro de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, HCl piridoxal, HCl piridoxina, riboflavina, HCl tiamina, cianocobalamina a una concentración de alrededor de 0,00005 g/L a alrededor de 0,9 g/L.

**(b) Temperatura**

Otro factor que se ha descubierto que contribuye al contenido rico en manosa de proteínas expresadas recombinantemente es la temperatura a la que se mantiene el cultivo celular. En consecuencia, la temperatura a la que las células huésped se cultivan puede también ser ajustada por sí sola o en combinación con los factores precedentes (por ejemplo, ajuste de la cadencia del cultivo celular y factores que afectan a la osmolalidad) para modular (por ejemplo, reducir) el contenido de manosa de glicoproteínas expresadas recombinantemente. En ciertas realizaciones, las células huésped se cultivan a alrededor de 31° C, o a alrededor de 32° C, o a alrededor de 33° C, o a alrededor de 34° C, o a alrededor de 35° C, o a alrededor de 36° C, o a alrededor de 37° C, o a alrededor de 38° C.

**III. Procedimientos del Cultivo Celular**

De acuerdo con los métodos de la presente invención, las células huésped mamíferas son cultivadas en un medio que permite la expresión de glicoproteínas recombinantes que tienen contenido de manosa bajo. Los procedimientos y condiciones de cultivo celular adecuados son bien conocidos en la técnica. Las células huésped (por ejemplo, células CHO y NSO) pueden ser cultivadas en una amplia variedad de formatos y recipientes de cultivo. Por ejemplo, las células huésped pueden ser cultivadas en formatos diseñados para la producción a gran escala o a pequeña escala de glicoproteínas. Adicionalmente, las células huésped pueden ser cultivadas adherentes a la parte inferior de frascos o placas de cultivo, o pueden estar en suspensión en cultivos de matraces agitados, biorreactores o botellas de rodillo. Para la producción de glicoproteínas en cantidades comercialmente relevantes, las células huésped pueden ser cultivadas en biorreactores, y preferiblemente biorreactores que tienen una capacidad de alrededor de 2 litros o más, o alrededor de 5 litros o más, o alrededor de 10 litros o más, o alrededor de 50 litros o más, o alrededor de 100 litros o más, o alrededor de 500 litros o más, o alrededor de 1000 litros o más o alrededor de 1500 litros o más, o alrededor de 2000 litro o más.

Las células huésped pueden ser cultivadas (por ejemplo, mantenidas y/o crecidas) en medio líquido y preferiblemente son cultivadas, o continuamente o intermitentemente, por métodos de cultivo convencionales como cultivo permanente, cultivo en tubo de prueba, cultivo por agitación (por ejemplo cultivo por agitación, cultivo de matraz de agitación, etc.) cultivo spinner con aireación , o fermentación. En ciertas realizaciones, las células huésped son cultivadas en matraces de de agitación. Las células huésped pueden ser cultivadas en un fermentador (por ejemplo, en un proceso de fermentación). Los procesos de fermentación incluyen, pero no están limitados a métodos por lotes, por lotes alimentado y continuos de fermentación. Los términos "proceso por lotes" y "fermentación por lotes" se refieren a un sistema cerrado en el que al composición de los medios, nutrientes, aditivos suplementarios y similares se establece al principio de la fermentación y no están sometidos a alteración durante la fermentación; sin embargo, se pueden hacer intentos para controlar dichos factores como el pH y la concentración de oxígeno para evitar la acidificación del medio en exceso y/o la muerte de microorganismos. Los términos "proceso por lotes alimentado" y "fermentación por lotes alimentada" se refieren a una fermentación por lotes con la excepción de que se añaden uno o más sustratos o suplementos (por ejemplo, añadidos en incrementos o continuamente) o las condiciones del cultivo celular se cambian mientras progresa la fermentación. Los términos "proceso continuo" y "fermentación continua" se refieren a un sistema en el que se añade un medio de fermentación definido continuamente a un fermentador y una cantidad igual de medio usado o "acondicionado" se retira simultáneamente, por ejemplo, para la recuperación del producto deseado (por ejemplo, glicoproteínas recombinantes). Se han desarrollado una variedad de dichos procesos y son bien conocidos en la técnica.

Una célula huésped que expresa un anticuerpo monoclonal humano, recombinante que enlaza con el IL-15 se puede cultivar en botellas de rodillo, frascos spinner de dos litros u otro medio de cultivo adecuado.

#### **IV. Recuperación de la Glicoproteína**

Después de la fase de producción de polipéptidos, la glicoproteína recombinante de interés puede ser recuperada del medio de cultivo usando técnicas que están bien establecidas en la técnica. La glicoproteína de interés preferiblemente se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado, a pesar de que también puede ser recuperada de lisados de la célula huésped.

Se divulga que el medio de cultivo o lisado es centrifugado para retirar los desechos celulares particulados. La glicoproteína después de eso es purificada de proteínas solubles contaminantes y polipéptidos usando procedimientos de purificación adecuados. Procedimientos de purificación adecuados incluyen, pero no están limitados a, fraccionamiento en inmunofluorescencia o columnas de intercambio de iones; precipitación con etanol, HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio de cationes como la DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación en sulfato de amonio; filtración de gel usando, por ejemplo, Sephadex-75; y columnas de Sefarosa A proteína para retirar los contaminantes como la IgG. Un inhibidor de la proteasa como el fluoruro fenil metil sulfonilo (PMSF) también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Alguien experto en la técnica apreciará que los métodos de purificación adecuado para la glicoproteína recombinante de interés pueden requerir modificación para tener en cuenta cambios en el carácter de la glicoproteína en el momento de la expresión en el cultivo celular recombinante.

En una realización particular de la presente invención, una glicoproteína recombinante expresada durante los métodos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo. Generalmente, los anticuerpos son inicialmente caracterizados por ELISA. Por ejemplo, se pueden recubrir placas de micropocillos con antígeno purificado como, por ejemplo, IL-15 en PBS, y después bloqueadas con proteínas irrelevantes como albúmina de suero bovino (BSA) diluida en PBS. Las diluciones de extractos de células cultivadas son añadidas a cada pocillo e incubadas durante 1-2 horas a 37° C. Las placas son lavadas con PBS/Tween 20 y después incubadas con un reactivo policlonal IgG Fc-específico de cabra antihumano conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37° C. Después del lavado, las placas se desarrollan con sustrato ABTS, y se analizan a un OD de 405.

Para determinar si los anticuerpos producidos por los métodos de la presente invención enlazan con epítopos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). El enlace MAb biotinilado puede ser detectado con una sonda etiquetada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISAs de los isotipos usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los pocillos de placas de microtitulación pueden ser recubiertos con 10 µg/ml de Ig antihumana durante toda la noche a 4° C. Después del bloqueo con un 5% de BSA, las placas se reaccionan con 10 µg/ml de anticuerpos o controles del isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos pueden entonces ser reaccionados con o IgG1 humana u otras sondas conjugadas específicas del isotipo humano. Las placas se desarrollan y analizan como se ha descrito anteriormente.

En una realización particular, una glicoproteína recombinante producida usando los métodos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano que enlaza con el IL-15 o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo. Para probar el enlace de los anticuerpos monoclonales IL-15 con células vivas que expresan el IL-15, se puede usar citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares y/o PBMCs humanas que expresan enlace de membrana con el IL-15 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) se mezclan con varias concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene un 0,1% de BSA y un 0,01% de NaN3 a 4° C durante 1 hora. Después del lavado, las células se reaccionan con anticuerpo IgG anti-humano etiquetado con Fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpos primaria. Las muestras pueden ser analizadas por instrumento FACScan usando propiedades de dispersión de luz y lateral para fijarse en células individuales y se determina el enlace de los anticuerpos etiquetados. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia (además o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden ser teñidas exactamente como se describe anteriormente y examinadas por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Las IgGs humanas Anti IL-15 pueden además ser probadas para la reactividad con el antígeno IL-15 por análisis Western blot. Brevemente, los extractos celulares de células huésped que expresan el IL-15 pueden ser preparadas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida de sulfato dodecil de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados serán transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con un 30% de suero de ratón, y exploradas con los anticuerpos monoclonales a ser probados. El enlace de la IgG humana puede ser detectado usando fosfatasa alcalina de IgG antihumano y desarrollado con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

**V. Composiciones Farmacéuticas**

También se divulga una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de las glicoproteínas recombinantes que tienen un contenido de manosa bajo. La composición farmacéutica puede incluir al menos una proteína terapéutica que tiene un contenido de manosa bajo como, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo que tiene bajo contenido de manosa (por ejemplo, anticuerpo monoclonal humana que enlaza con el IL-15 o un fragmento que enlaza con el antígeno del mismo). Una composición farmacéutica puede incluir una o más glicoproteínas recombinantes que tienen un contenido de manosa bajo, formuladas junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden también ser administradas en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, como agentes antiinflamatorios, DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, quimioterapéuticos, y agentes para la psoriasis. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser administradas en conjunción con terapia de radiación. La coadministración con otros anticuerpos, como anticuerpos específicos del CD4 y anticuerpos específicos del IL-2, también está comprendida por la invención. Dichas combinaciones con anticuerpos específicos del CD4 o anticuerpos específicos del IL-2 son consideradas particularmente útiles para tratar enfermedades autoinmunes y rechazos de trasplantes.

Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción retrasada, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, vertebral o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, la glicoproteína recombinantes, por ejemplo, un anticuerpo, molécula biespecífica o multiespecífica, puede ser recubierta en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (ver por ejemplo, Berge, S.M. y otros, J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977)). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición básicas. Las sales de adición ácidas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, como el clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos como los ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos fenil-sustituidos, ácidos alcanoicos hidroxí, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, ácidos sulfónicos y similares. Las bases de adición básicas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos térreos, como el sodio, el potasio, el magnesio, el calcio y similares, así como aminos orgánicos no tóxicos, como la N,N'-dibenziletilediamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenediamina, procaína y similares.

Una composición puede ser administrada por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciara por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden ser preparados con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, como el etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son conocidos de forma general por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede ser administrado a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones reguladoras salinas y acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan y otros, Neuroimmunol. 7:27 (1984)).

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. También pueden ser incorporados compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma, u otras estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio

de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones son preparadas incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles par la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Los regímenes de dosificación son ajustados para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser administrados una vez o dos veces semanalmente por inyección subcutánea o una vez o dos veces mensualmente por inyección subcutánea.

Es especialmente ventajoso el formular composiciones parenterales en formas de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseada en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificación para las formas de unidades de dosificación se dictan por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser conseguido, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, como el ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, como el ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden ser expresadas convenientemente en forma de unidades de dosificación y pueden ser preparadas por cualquier método conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinado con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que está siendo tratado, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinado con un material portador para producir una forma de dosificación única será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por cien, está cantidad variará de alrededor de alrededor de un 0,001 por ciento a alrededor del noventa por ciento del ingrediente activo, preferiblemente de alrededor del 0,005 por ciento a alrededor del 70 por ciento, más preferiblemente de alrededor del 0,01 por ciento a alrededor del 30 por ciento.

Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen formulaciones de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas espumas o de pulverización que contienen dichos portadores como se conoce en la técnica que son apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones incluyen polvos, espráis, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede ser mezclado bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, regulador o propelente que se pueda requerir.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se usan en la presente significan modos de administración que no sean la administración enteral o tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (como el glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y

similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de surfactantes.

5 Estas composiciones pueden también contener adyuvantes como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede ser asegurada tanto por procesos de esterilización, supra, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. También puede ser deseable el incluir agentes isotónicos, como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción como el monoesterato de aluminio y la gelatina.

10 Cuando los compuestos son administrados como productos farmacéuticos, a humanos y animales, pueden ser proporcionados solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de un 0,001 a un 90% (más preferiblemente, de un 0,005 a un 70%, como de un 0,01 a un 30%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos que pueden ser usados en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables pro métodos convencionales conocidos por aquellos expertos en la técnica.

20 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tiene un conocimiento ordinario de la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición será aquella cantidad del compuesto que es la dosis efectiva más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, preferiblemente administrada próxima al sitio del objetivo. Si se desea, la dosis diaria efectiva de una composición terapéutica puede ser administrada como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas separadamente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Mientras que es posible que un compuesto sea administrado solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

25 30 35 40 45 Las composiciones terapéuticas pueden ser administradas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica puede ser administrada con un dispositivo de inyección hipodérmico sin agujas, como los dispositivos divulgados en las Patentes, U.S: N° 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, ó 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles incluyen: la patente U.S. N° 4.487.603, que divulga una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una tasa controlada; la Patente U.S. N° 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente U.S. N° 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una tasa de infusión precisa; la Patente U.S. N° 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continuada del fármaco; la Patente U.S. N° 4.439.196, que divulga un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos multi-cámara; y la Patente U.S. N° 4.475.196, que divulga un sistema de administración de fármaco osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

50 55 60 65 Las glicoproteínas terapéuticas pueden ser formuladas para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos cruzan la BBB (si se desea), pueden ser formulados, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, ver por ejemplo, las Patentes U.S. 4.522.811, 5.374.548 u 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que son transportadas selectivamente a las células u órganos específicos, mejorando así la administración del fármaco dirigida (ver por ejemplo, V.V. Ranade J. Clin. Pharmacol. 26:685 (1989). Porciones objetivo ejemplares incluyen el folato o la biotina (ver por ejemplo, la Patente U.S. 5.416.016 de Low y otros); manósidos (Umezawa y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038 (1988));

anticuerpos (P.G. Bloeman y otros FEBS Lett. 357:140 (1995); M. Owais y otros, Antimicrob. Agents Chemother 39:180 (1995)); receptor de la proteína A surfactante (Briscoe y otros Am. J. Physiol. 1233:134 (1995)), diferentes especies de los cuales pueden comprender las formulaciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y otros J. Biol. Chem. 269:9090 (1994)); ver también K. Keinanen; M.L. Laukkanen FEBS Lett. 346:123 (1994); J.J Killion; I.J Fidler Immunomethods 4:273 (1994). Los compuestos terapéuticos pueden ser formulados en liposomas; los liposomas pueden incluir una porción objetivo. Se divulga que los compuestos terapéutico en los liposomas pueden ser administrados por inyección de bolo a un sitio próximo al tumor o la infección. La composición debe ser fluida en la medida que exista inyectabilidad fácil. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias u hongos.

Una glicoproteína recombinante puede ser formulada para evitar o reducir el transporte a través de la placenta. Esto se puede hacer por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por PEGilación del anticuerpo o por el uso de fragmentos F(ab)<sub>2</sub>. Se pueden hacer referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of poly-ethylene-glycol immunoglobulin conjugates". La resistencia a la degradación enzimática J Immunol Methods. 152:177-190; y a Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann Allergy Asthma Immunol 74:279-283. Esto es particularmente relevante cuando la glicoproteína es un anticuerpo usado para tratar o evitar aborto espontaneo recurrente.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" para artritis reumatoide resultará preferiblemente en una Definición Preliminar ACR20 de Mejora en pacientes, más preferido en una Definición Preliminar ACR50 de Mejora e incluso más preferido en una Definición Preliminar ACR50 de Mejora e incluso más preferido en una Definición Preliminar ARCD70 de Mejora.

La Definición Preliminar ACR20 de Mejora se define como:  $\geq 20\%$  de mejora en Recuento de Articulaciones Dolorosas (TCJ) y Recuento de Articulaciones Hinchadas (SWJ)  $\geq 20\%$  de mejora en 3 de las siguientes 5 valoraciones: Valoración del Dolor del Paciente (VAS), Valoración Global del Paciente (VAS), Valoración Global del médico (VAS), Discapacidad Autoevaluada del Paciente (HAQ), reactante de la Fase aguda (CRP o ESR).

La ACR50 y la ACR70 se definen de la misma manera con mejoras  $\geq 50\%$  y  $\geq 70\%$ , respectivamente. Para detalles adicionales ver Felson y otros en American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism 38: 727-735 (1995).

La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede ser evaluada en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición *in vitro* por ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o aliviar de otra forma los síntomas en un sujeto. Alguien experto en la técnica será capaz de determinar dichas cantidades en base a factores como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada.

La capacidad de los anticuerpos de tratar o evitar psoriasis también puede ser evaluada de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida que la composición es administrable por jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina regulada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de recubrimiento como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol o el sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción a largo plazo de composiciones inyectables puede ser producida incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo está protegido adecuadamente, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

Los ejemplos que no pertenecen a la invención son sólo para propósitos ilustrativos.

## 60 EJEMPLOS

En todos los ejemplo mencionados anteriormente, se usó un anticuerpo monoclonal completamente humano que enlaza con el IL-15 que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:2 como una glicoproteína recombinante ejemplar (referida en los Ejemplos como "glicoproteína recombinante ejemplar"). Sin embargo, estará claro para alguien experto en la técnica que el

contenido de manosa de cualquier glicoproteína recombinante se puede modular, como se ha mencionado en la presente .

#### **Ejemplo 1: La osmolalidad afecta al contenido de manosa de las glicoproteínas recombinantes**

Para investigar el efecto de la osmolalidad en el contenido de manosa de glicoproteínas, se analizó el contenido de manosa de una glicoproteína recombinante ejemplar a osmolalidades diversas en tanto cultivos de matraces de agitación como de biorreactor. Como se demuestra en la Figura 1, el contenido rico en manosa aumentó de alrededor del 14% a alrededor del 24% con el aumento de la osmolalidad del medio de alrededor de 500 a alrededor de 580 mOsm/Kg.

En un experimento adicional, se añadieron 20 mM de un osmoprotector, betaína, al cultivo celular para proporcionar evidencia adicional con respecto a la relación entre la osmolalidad y el contenido rico en manosa. La siguiente tabla resume los resultados de uno de tales experimentos.

**Tabla 1**

Muestra	% Hi-M	
36°C, medio de cultivo	19	
36°C, medio de cultivo + Betaína	14	
37°C, medio de cultivo	18	
37°C, medio de cultivo + Betaína	13	

Todavía otra evidencia de la correlación entre el contenido rico en manosa y la osmolalidad se recoge en la Figura 2. La adición de alrededor de 20 mM de betaína al medio de cultivo celular redujo dramáticamente el contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar. Por ejemplo, cuando la osmolalidad era de alrededor de 300 mOsm/Kg, el contenido rico en manosa se redujo de alrededor del 9,5% en alrededor de 0 mM de betaína a alrededor del 4,5% en el momento de la adición de 20 mM de betaína (es decir, una reducción de alrededor del 5% en el contenido rico en manosa). De manera similar, cuando la osmolalidad era de alrededor de 400 mOsm/kg, el contenido rico en manosa se redujo de alrededor del 16,5% en alrededor de 0 mM de betaína a alrededor del 7,5% en el momento de la adición de 20 mM de betaína (es decir, una reducción de alrededor del 9% en el contenido rico en manosa). Además, a una osmolalidad de alrededor de 500 mOsm/Kg, el contenido rico en manosa se redujo de alrededor del 25% en alrededor de 0 mM de betaína a alrededor del 9,5% en el momento de la adición de alrededor de 20 mM de betaína (es decir, una reducción de alrededor del 15,5% en el contenido rico en manosa).

#### **Ejemplo 2: La concentración de K<sup>+</sup> en el cultivo puede ser controlada para modular el contenido de manosa de las glicoproteínas recombinantes**

En un experimento adicional, la concentración de una o más sales en el medio de cultivo celular se controló para modular (por ejemplo, reducir) el contenido de manosa (por ejemplo, contenido rico en manosa) de la glicoproteína recombinante ejemplar. En un experimento ejemplar, la concentración de K<sup>+</sup> en el medio de cultivo celular se controló y mostró que afectaba al contenido de manosa y específicamente, al contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar. Específicamente, se examinó el contenido rico en manosa (es decir, especie M5 o mayor) de la glicoproteína recombinante ejemplar producida cultivando una célula huésped que expresa la glicoproteína a 0 15 mM o 45 mM.

Como se muestra en las Figuras 3 y 4, el porcentaje de contenido rico en manosa aumentó de alrededor del 3% a alrededor del 13% con el aumento concomitante en la osmolalidad. Una osmolalidad de entre alrededor de 370 y alrededor de 500 mOsm/Kg llevó a un aumento en el contenido rico en manosa que excedió el 10% de la composición de glicoproteína.

En un experimento adicional, se demostró, como se muestra en la Figura 5, que el intervalo de concentración óptimo para la concentración de K<sup>+</sup> en el medio de cultivo celular es de alrededor de 0 mM a alrededor de 70 mM para mantener el porcentaje de contenido rico en manosa de una glicoproteína recombinante por debajo del 10%.

#### **Ejemplo 3: La concentración de Na<sup>+</sup> en el medio de cultivo celular puede ser controlada para modular el contenido de manosa de glicoproteínas recombinantes**

En un experimento adicional, la concentración de Na<sup>+</sup> se controló para modular (por ejemplo, reducir) el contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar. En un experimento ejemplar, un aumento en la

concentración de Na<sup>+</sup> en el medio de cultivo celular se mostró que contribuía a un aumento en el porcentaje del contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar.

5 La Figura 6 demuestra que el intervalo de concentración óptimo para Na<sup>+</sup> está entre alrededor de 0 mM y alrededor de 200 mM para mantener el porcentaje de contenido rico en manosa por debajo del 10%.

**Ejemplo 4: Los aminoácidos contribuyen al contenido rico en manosa de las glicoproteínas recombinantes.**

10 En otro experimento, se examinó el efecto de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo celular en el contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar. Como se muestra en la Figura 7, el porcentaje de contenido rico en manosa de una glicoproteína recombinante aumenta de alrededor del 4% a alrededor del 10% duplicando la concentración de los 20 aminoácidos en el medio de alimentación. Este experimento demostró que un medio enriquecido para aminoácidos resulta en un aumento en el contenido de glicoproteínas ricas en manosa expresadas por una célula huésped cultivada en dicho medio.

15 **Ejemplo 5: La composición total de la composición del medio de alimentación puede contribuir al contenido rico en manosa de las glicoproteínas recombinantes**

20 En este experimento, se examinó el efecto de diferentes tipos de medios de alimentación en el contenido rico en manosa de una glicoproteína recombinante ejemplar. Específicamente, se investigó el efecto de un medio de alimentación modificado sustancialmente libre de aminoácidos, L-Alanina, L-Arginina HCL, Ácido L-Aspártico y Ácido L-Glutámico, y también teniendo una concentración más baja de CaCl, MgCL, KCl y piruvato sódico en relación al medio no modificado en el contenido rico en manosa de la glicoproteína recombinante ejemplar. Como se recoge en la Figura 8, el contenido rico en manosa era de alrededor del 4% cuando se usó el medio de alimentación modificado y este porcentaje aumentó a alrededor del 13% cuando se usó el medio de alimentación no modificado.

25 **Ejemplo 6: Efecto de la temperatura en el contenido rico en manosa**

30 Se examinó el efecto de cuatro temperaturas diferentes en el contenido rico en manosa usando dos medios de alimentación diferentes. Los siguientes datos en la Tabla II indican que hubo un aumento en el porcentaje de contenido rico en manosa con un aumento en la temperatura.

35 **Tabla II**

Nombre de la Muestra	36° C		35° C		34° C	
	Conc. (g/L)	% Hi-Man	Conc. (g/L)	% Hi-Man	Conc. (g/L)	% Hi-Man
medio de alimentación 1	3,2	14	3,1	17	2,8	22
medio de alimentación 2	2,0	13	2,1	13	2,1	14

40 **LISTA DE SECUENCIAS**

45

<110> Amgen Inc.

<120> Métodos para Modular el contenido de Manosa de Proteínas Recombinantes

50

<130> A-1059-WO-PCT

<140> Todavía sin Asignar

<141> 2007-01-23

55

<150> 60/761,477

<151> 2006-01-23

<150> 11/644,345

<151> 2006-12-22

60

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

65

<210> 1

<211> 390

ES 2 391 656 T3

	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(390)	
	<400> 1	
10		
	gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48	
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
	1 5 10 15	
15	tct ctg aag atc tcc tgt aag gtt tct gga tac ttc ttt acc acc tac 96	
	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Phe Phe Thr Thr Tyr	
	20	
20	tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tat atg 144	
	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met	
	35 40 45	
25	ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192	
	Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe	
	50	
25	caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240	
	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
30	ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288	
	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
35	gcg aga ggg ggt aac tgg aac tgc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336	
	Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
	100 105 110	
35	ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc 384	
	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	
	115 120 125	
40	ctg gca 390	
	Leu Ala	
	130	
45		
	<210> 2	
	<211> 130	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 2	

ES 2 391 656 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Phe	Phe	Thr	Thr	Tyr	
				20					25					30			
10	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
20	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Gly	Gly	Asn	Trp	Asn	Cys	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115					120					125				
40	Leu	Ala															
	130																
45	<210>	3															
	<211>	357															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
50	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(357)															
55	<400>	3															
60	gaa	att	gtg	ttg	acg	cag	tct	cca	ggc	acc	ctg	tct	ttg	tct	cca	ggg	48
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
65	gaa	aga	gcc	acc	ctc	tcc	tgc	agg	gcc	agt	cag	agt	gtt	agc	agc	agc	96
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	
				20					25					30			
70	tac	tta	gcc	tgg	tac	cag	cag	aaa	cct	ggc	cag	gct	ccc	agg	ctc	ctc	144
	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
			35					40					45				
75	atc	tat	ggt	gca	tcc	cgc	agg	gcc	act	ggc	atc	cca	gac	agg	ttc	agt	192

ES 2 391 656 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

5 ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

10 cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cgg tat ggt agc tca cac 288  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His  
85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc agc cga act gtg gct gca 336  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

15 cca tct gtc ttc atc ttc ccg 357  
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
115

20 <210> 4  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 4

30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

35 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

40 Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

45 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His  
85 90 95

50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

55 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
115

60 <210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

65 <400> 5

Thr Tyr Trp Ile Gly  
1 5

ES 2 391 656 T3

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5  
<400> 6  
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Pro Phe Gln  
1 5 10 15  
10  
<210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15  
<400> 7  
20  
Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr  
1 5  
25  
<210> 8  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
30  
<400> 8  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
35  
<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
40  
<400> 9  
45  
Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr  
1 5  
50  
<210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
55  
<400> 10  
Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His Thr  
1 5

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de reducir el contenido rico en manosa de glicoproteínas producidas recombinantemente de tal forma que menos de alrededor del 10% de las glicoproteínas en la composición tengan más de 4 residuos de manosa por oligosacárido N-ligado, comprendiendo cultivar una célula huésped mamífera, que expresa la glicoproteína recombinante, durante alrededor de 5 a 14 días en un medio de cultivo que tiene una osmolalidad de alrededor de 250 mOsm/Kg a alrededor de 600 mOsm/kg, el medio de cultivo comprendiendo betaína a una concentración de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM, potasio a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 70 mM, y sodio a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM.
- 10 **2.** Un método de reducir el contenido rico en manosa de anticuerpos producidos recombinantemente, o un fragmento que enlaza con el antígeno de los mismos, de tal forma que menos de alrededor del 10% de las glicoproteínas en la composición tengan más de 4 residuos de manosa por oligosacárido N-ligado, comprendiendo cultivar una célula huésped mamífera, que expresa el anticuerpo recombinante o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo, días en un medio de cultivo que tiene una osmolalidad de alrededor de 250 mOsm/Kg a alrededor de 600 mOsm/kg, el medio de cultivo comprendiendo betaína a una concentración de alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM, potasio a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 70 mM, y sodio a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM.
- 15 **3.** El método de la reivindicación 2 para reducir el contenido rico de manosa de anticuerpos monoclonales humanos recombinantes, o el fragmento que enlaza con el antígeno de los mismos, que enlaza con el IL-15, en donde el anticuerpo o el fragmento que enlaza con el antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:4, o sustituciones de aminoácido conservadoras de la misma, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido expresada en la SEQ ID NO:2, o sustituciones de aminoácido conservadora de la misma.
- 20 **4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la osmolalidad del medio de cultivo está entre alrededor de 250 y alrededor de 500 mOsm/KG, o entre alrededor de 250 y alrededor de 380 mOsm/Kg.
- 25 **5.** El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo está sustancialmente libre de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo consistente de alanina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico.
- 30 **6.** El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo comprende una o más vitaminas seleccionadas del grupo consistente de biotina, pantotenato de calcio-D, cloruro de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, HCl piridoxal, HCl piridoxina, riboflavina, HCl tiamina, cianocobalamina a una concentración de alrededor de 0,00005 g/L a alrededor de 0,9 g/L.
- 35 **7.** El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo comprende glucosa a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 90 mM.
- 40 **8.** El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo comprende una o más peptonas seleccionadas del grupo consistente de extracto de levadura, hidrolizado de levadura, peptona de soja, hidrolizado de soja, peptona de trigo e hidrolizado de trigo, a una concentración de alrededor de 0,5 g/L a alrededor de 60 g/L.
- 45 **9.** El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo comprende al menos dos osmoprotectores en una cantidad necesaria para mantener la osmolalidad en de alrededor de 250 mOsm/KG a alrededor de 600 mOsm/Kg.
- 50 **10.** El método de la reivindicación 9, en donde uno de los mencionados osmoprotectores es seleccionado del grupo consistente de glicina, L-treonina, L-prolina, y derivados de los mismos.
- 11.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la célula huésped es una célula CHO.

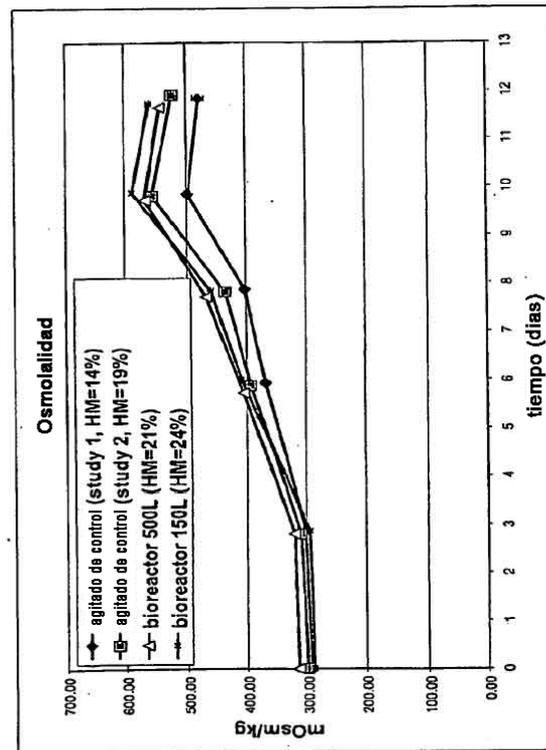


Figura 1

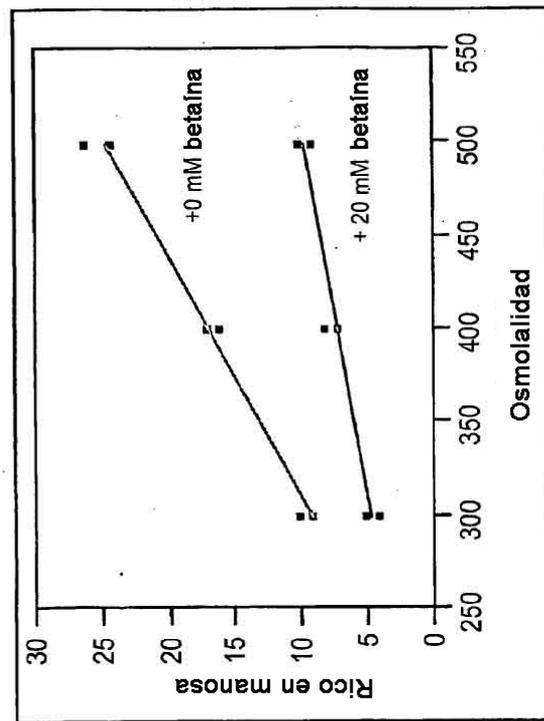


Figura 2

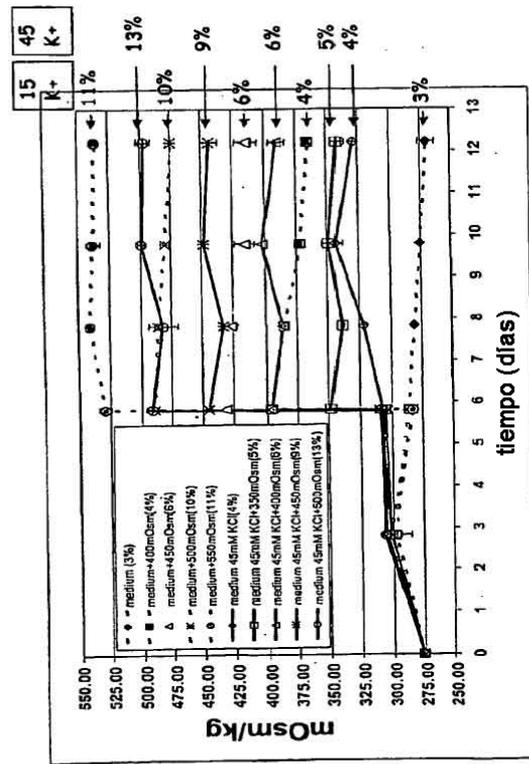


Figura 3

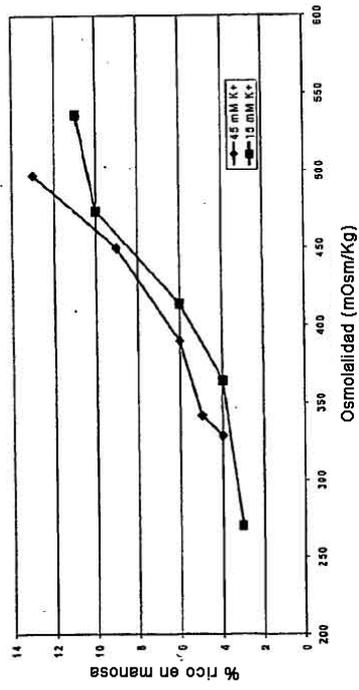


Figura 4

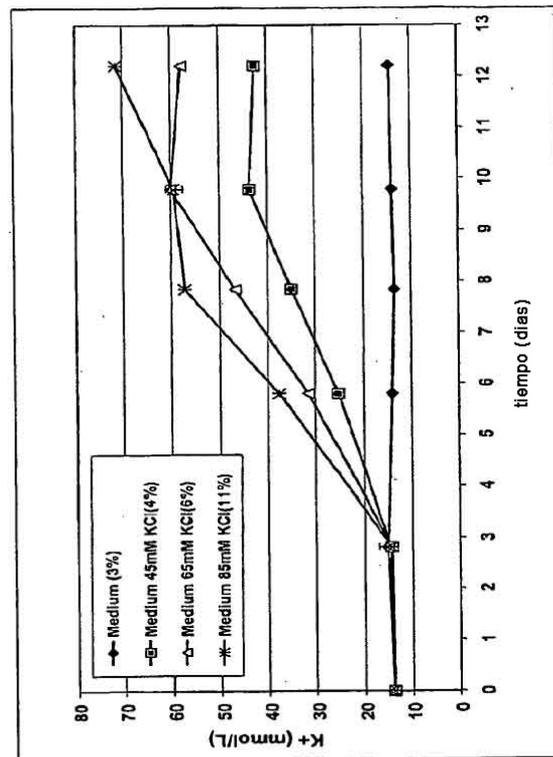


Figura 5

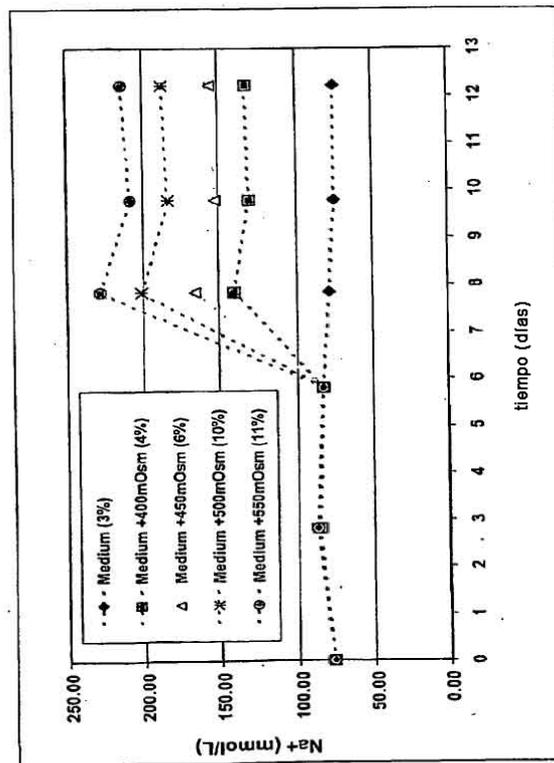


Figura 6

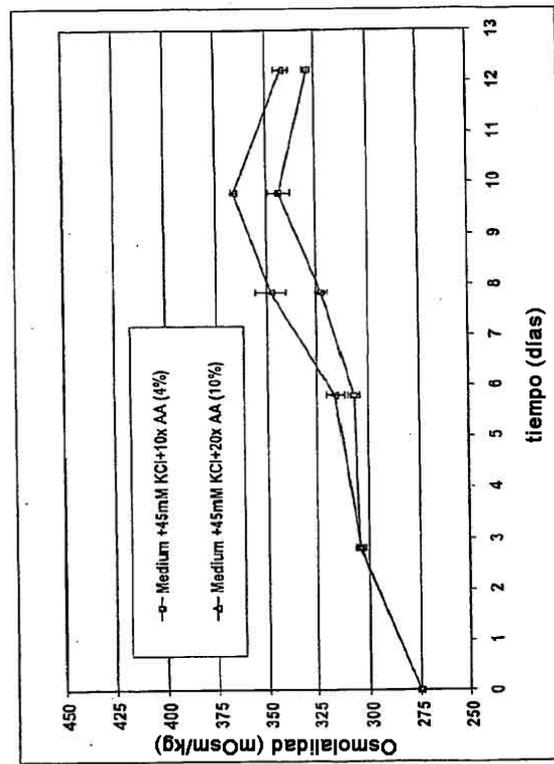


Figura 7

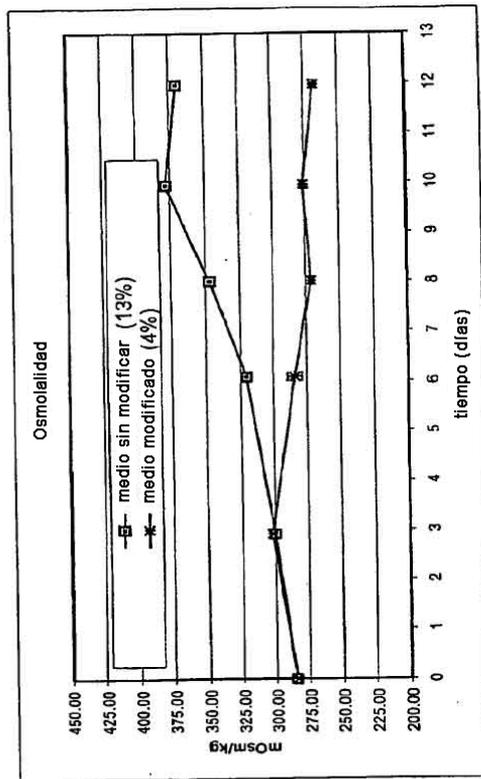


Figura 8