(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 399 940**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2008** **E 08745872 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2135081**

(54) Título: **Métodos relacionados con la glucosilación de la superficie celular**

(30) Prioridad:

16.04.2007 US 923655 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2013

(73) Titular/es:

MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
675 WEST KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

COLLINS, BRIAN, EDWARD;
BOSQUES, CARLOS, J.;
ZHU, XIANGPING;
BULIK, DOROTA, A.;
THIRUNEELAKANTAPILLAI, LAKSHMANAN;
PARSONS, IAN, CHRISTOPHER;
SCHRIVER, ZACHARY;
CHILLAKURU, RAJEEV y
VENKATARAMAN, GANESH

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 399 940 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

Métodos relacionados con la glucosilación de la superficie celular

Antecedentes

El patrón de glucosilación de una glucoproteína juega a menudo un papel significativo en la función de esa glucoproteína. Para dar unos pocos ejemplos, un patrón de glucosilación de una glucoproteína puede afectar a su capacidad para plegarse correctamente, a su estabilidad (*por ejemplo*, resistencia a la degradación proteolítica y/u otra degradación), a la actividad catalítica, a las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas, y/o a la capacidad de esa glucoproteína para interactuar apropiadamente con otras moléculas. Como alternativa, o adicionalmente, un patrón de glucosilación de una glucoproteína puede afectar al transporte y a la selección de dianas de la glucoproteína. Por ejemplo, un patrón de glucosilación de una glucoproteína puede afectar a si la glucoproteína sigue siendo intracelular (incluyendo, *por ejemplo*, el envío correcto de la glucoproteína al compartimiento o compartimientos subcelulares apropiados), a si la glucoproteína estará unida a la membrana, y/o a si la glucoproteína será segregada a partir de la célula. Por estas razones, es importante ser capaces de identificar y/o caracterizar patrones de glucosilación de glucoproteínas.

El documento WO 2007/012695 describe métodos para producir composiciones de hidratos de carbono a partir de tejidos animales, así como métodos para el análisis de glicomas.

Suzuki et al. (International Journal of Oncology, 28, 155-160, 2006) enseñan que la alteración de la sialilación de la superficie celular o la expresión de N-glucano regula la adhesión celular a galectina-1 en linfoma maligno humano.

Stamatos et al. (Journal of Leukocyte Biology, 75, 307-313, 2004) enseña que la desialilación de glucoconjugados en la superficie de monocitos purificados usando neuraminidasa exógena activa cinasa 1/2 extracelular regulada por señales, un intermedio en las rutas de señalización intracelulares.

Sumario

La descripción se basa, en parte, en el reconocimiento de que los glucanos de la superficie celular pueden proporcionar información sobre el estado de la célula, por ejemplo como se refleja en la glucosilación de proteínas producidas por la célula. En particular, se ha encontrado que los glucanos de la superficie celular pueden proporcionar información sobre el estado de glucosilación de una glucoproteína producida (y opcionalmente segregada) por la célula. De este modo, no es necesario aislar una proteína diana de una célula a fin de obtener información sobre su estado de glucosilación. En su lugar, la glucosilación de una o más proteínas o lípidos sobre la superficie celular se puede evaluar para revelar indirectamente uno o más aspectos de la glucosilación de una proteína diana. Esto puede simplificar y facilitar el análisis de la glucosilación de proteínas diana.

Entre otras cosas, la presente descripción incluye métodos en los que se analizan glucanos de la superficie celular sobre células que producen al menos una glucoproteína diana. La detección de los glucanos de la superficie celular sirve como un poder para la detección de glucosilación sobre la glucoproteína diana (esto es, los glucanos detectados no están en o proceden de las glucoproteínas diana). En muchos casos, la glucoproteína diana es una glucoproteína que no pertenece a la superficie celular. Por ejemplo, la glucoproteína diana es soluble o se segrega a partir de la célula. En tales casos, la detección de los glucanos de la superficie celular sirve como un poder para la determinación de estructuras de glucanos particulares en la glucoproteína producida que no pertenece a la superficie celular.

En ciertos casos, la presente descripción incluye métodos en los que una célula que produce una glucoproteína de interés (por ejemplo, una glucoproteína no perteneciente a la superficie celular, o cualquier otra glucoproteína distinta de aquella cuyos glucanos asociados están siendo analizados directamente) se cultiva en condiciones que permiten la expresión de la glucoproteína de interés, y después se pone en contacto con uno o más reactivos que detectan la glucosilación de un glucano de la superficie celular que no es parte de la glucoproteína de interés. Típicamente, tales métodos no incluirán una etapa de aislar la glucoproteína de interés. Además, en muchos casos, las etapas no incluyen ningún análisis directo de la glucoproteína de interés. De este modo, en tales casos, el análisis del glucano de la superficie celular se usa como un poder para evaluar la glucosilación de la glucoproteína diana.

En algunos casos de la descripción, la célula relevante es una célula de mamífero, por ejemplo una célula de CHO. En algunos casos de la descripción, la glucoproteína diana es una glucoproteína terapéutica; en algunos casos, la glucoproteína diana comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En algunos casos, la descripción incluye métodos para identificar una propiedad de glucosilación de una glucoproteína producida mediante una célula evaluando una propiedad de un glucano de la superficie celular de la célula (por ejemplo, un glucano de la superficie celular en una glucoproteína o glucolípido sobre la superficie de la célula). En otros casos, una propiedad de glucano de la superficie celular se puede correlacionar más generalmente con el estado de la célula, por ejemplo con la viabilidad, morfología, densidad u otra propiedad de la célula que se puede ver afectada por diferentes condiciones del procedimiento, por ejemplo en un procedimiento para cultivar la

célula, por ejemplo en un procedimiento para producir un producto de glucoproteína a partir de una célula. De este modo, se pueden usar casos de la descripción en una variedad de diferentes contextos, por ejemplo, entre otras cosas, los glucanos de la superficie celular se pueden evaluar a fin de:

(a) evaluar o predecir las características de glucosilación de un producto de glucoproteína, por ejemplo un producto de glucoproteína terapéutico,

(b) monitorizar la calidad del producto de glucoproteína (por ejemplo, estructura de glucano) durante una o más etapas en un procedimiento para producir el producto de glucoproteína,

(c) detectar cambios en las condiciones del procedimiento en un procedimiento para producir un producto de glucoproteína,

(d) proporcionar información sobre (por ejemplo, comparar) diferentes lotes de una preparación de glucoproteína,

(e) proporcionar información sobre (por ejemplo, comparar) el estado celular o el estado del producto de glucoproteína durante diferentes etapas en un procedimiento para producir el producto de glucoproteína,

(f) proporcionar información sobre (por ejemplo, comparar) el estado celular o el estado del producto de glucoproteína durante la misma etapa en una pluralidad de procedimientos para producir el producto de glucoproteína; y/o

(g) proporcionar información sobre (por ejemplo, comparar) características de glucosilación de un producto de glucoproteína producido mediante dos o más células o poblaciones de células (por ejemplo, poblaciones clonales derivadas de células individuales seleccionadas de una población celular inicial) que se hacen crecer en condiciones similares o idénticas.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por una célula, comprendiendo el método las etapas de:

a) determinar una diferencia en el patrón de glucosilación entre:

(i) un primer patrón de glucosilación de superficie presente bajo un primer conjunto de condiciones en la superficie de una célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular; y

(ii) un segundo patrón de glucosilación de superficie presente bajo un segundo conjunto de condiciones en la superficie de la célula; y

b) basándose en la diferencia determinada, establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por la célula.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método que comprende las etapas de

a) determinar una diferencia en el patrón de glucosilación entre:

(i) un primer patrón de glucosilación de superficie presente en la superficie de células en un primer cultivo de células; y

(ii) un segundo patrón de glucosilación de superficie presente en la superficie de células en cultivo, en el que el primer cultivo y el segundo cultivo difieren entre sí con respecto a al menos un parámetro; y

b) basándose en la diferencia determinada, establecer efectos del al menos un parámetro sobre la glucosilación de glucoproteínas de interés no pertenecientes a la superficie celular producidas por células en cultivo; caracterizado porque las glucoproteínas de interés son glucoproteínas no pertenecientes a la superficie celular.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por una célula, comprendiendo el método:

a) proporcionar una célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, célula la cual tiene al menos un glucano de la superficie celular unido a la superficie de la célula, de manera que la célula tiene un patrón de glucosilación de la superficie celular; y

b) determinar al menos una característica del patrón de glucosilación de la superficie celular; y

c) basándose en la característica determinada, establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que la característica determinada se correlaciona con la una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para determinar una o más diferencias en el patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, que comprende:

a) proporcionar una primera célula que comprende al menos un primer glucano de la superficie celular unido a la superficie de la primera célula, primera célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

b) caracterizar el al menos un primer glucano de la superficie celular;

c) proporcionar una segunda célula que comprende al menos un segundo glucano de la superficie celular unido a la superficie de la segunda célula, segunda célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

d) caracterizar el al menos un segundo glucano de la superficie celular;

e) determinar una o más diferencias entre el primer glucano de la superficie celular y el segundo glucano de la superficie celular; y

f) establecer una o más diferencias en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que la diferencia o diferencias determinadas entre el primer glucano de la superficie celular y el segundo glucano de la superficie celular se correlacionan con la una o más diferencias en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula que comprende al menos un glucano de la superficie celular unido a la superficie de la célula, célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular; y

b) caracterizar el al menos un glucano de la superficie celular; y

c) determinar una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que el al menos un glucano caracterizado se correlaciona con la una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

Breve descripción de los dibujos

La *Figura 1* muestra los niveles de fucosilación central en una glucoproteína de anticuerpo expresada no perteneciente a la superficie celular producida en medio de cultivo celular con o sin suplementación elevada de glucosamina.

La *Figura 2* muestra niveles de fucosilación central en glucoproteínas de la superficie celular producidas en medio de cultivo celular con o sin suplementación elevada de glucosamina.

Las *Figuras 3A-B* muestran estructuras de glucano de glucoproteínas de la superficie celular que se hacen crecer en medio de control (Figura 3A) o en medio que contiene una concentración elevada de glucosamina (Figura 3B).

La *Figura 4* muestra el análisis de cromatografía de líquidos de los niveles de ácido siálico de glucoproteínas expresadas (no pertenecientes a la superficie celular) recombinantes de anticuerpos y de la superficie celular.

La *Figura 5* muestra niveles de ácido siálico en glucoproteína de anticuerpo expresada producida en medios de cultivo celular con o sin una concentración elevada de N-acetilmanosamina, según se mide mediante el marcaje con DMB y mediante HPLC.

La *Figura 6* muestra niveles de ácido siálico en glucoproteínas de la superficie celular en medios de cultivo celular con o sin una concentración elevada de N-acetilmanosamina, como se mide mediante el marcaje con DMB y mediante HPLC.

La *Figura 7* muestra niveles de ácido siálico en glucoproteínas de la superficie celular producidas en medios de cultivo celular con o sin una concentración elevada de N-acetilmanosamina, según se mide mediante unión de lectina específica de ácido siálico y mediante citometría de flujo.

La *Figura 8* muestra el contenido de ácido siálico de la superficie celular determinado mediante cromatografía de intercambio aniónico de glucanos de la superficie celular. La migración de los patrones neutro (NA2F), monosialilado (A1), disialilado (A2), o trisialilado (A3) se indica en el cromatograma de la parte superior. El cromatograma inferior ilustra datos representativos procedentes de glucanos de la superficie celular de células de CHO, y los porcentajes relativos.

Definiciones

Aproximadamente, *alrededor de*, *aprox.*: Como se usan aquí, los términos “aproximadamente”, “alrededor de” o “aprox.”, según se aplican a uno o más valores de interés, se refieren a un valor que es similar a un valor de referencia señalado. En ciertos casos, los términos “aproximadamente”, “alrededor de” o “aprox.” se refieren a un intervalo de valores que caen dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos del valor de referencia señalado.

Muestra biológica: La expresión “muestra biológica”, como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra sólida o fluida obtenida de, excretada por o segregada por cualquier célula u organismo vivo, incluyendo, pero sin limitarse a, cultivo tisular, muestra de biorreactor, tejido humano o animal, plantas, frutas, vegetales, microorganismos monocelulares (tales como bacterias y levaduras) y organismos multicelulares. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, fluido seminal, fluido cerebroespinal, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un transudado, un exudado (por ejemplo, fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por enfermedad tal como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica). Una muestra biológica también puede ser, por ejemplo, una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia), puede comprender células (ya sea células primarias o células cultivadas), medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano, cultivo tisular.

Glucoproteína de la superficie celular: Como se usa aquí, la expresión “glucoproteína de la superficie celular” se refiere a una glucoproteína, al menos una porción de la cual está presente en la superficie exterior de una célula. En algunos casos, una glucoproteína de la superficie celular es una proteína que está situada sobre la superficie celular, de manera que al menos una de las estructuras de glucano está presente en la superficie exterior de la célula.

Glucano de la superficie celular: Un “glucano de la superficie celular” es un glucano que está presente en la superficie exterior de una célula. En muchos casos de la presente descripción, un glucano de la superficie celular está enlazado covalentemente a un polipéptido como parte de una glucoproteína de la superficie celular. Un glucano de la superficie celular también puede estar enlazado a un lípido de la membrana celular.

Correlación: El término “correlación”, como se usa aquí, se refiere al establecimiento de una relación predecible entre dos cosas. En casos descritos aquí, un patrón de glucosilación (o una característica del mismo) en la superficie de una célula se correlaciona con un patrón de glucosilación (o una característica del mismo) de un glucoconjugado diana (por ejemplo, glucoproteína) producido por la célula. Los patrones (o características) correlacionados no necesitan ser idénticos entre sí en tanto que uno se pueda predecir a partir del otro. Una vez que se establece una correlación, se puede registrar, por ejemplo, en un registro escrito, o se puede fijar de otro modo en un medio o fuente de memoria (por ejemplo, un medio legible por ordenador o un banco o disco de memoria de ordenador). La detección de un patrón de glucosilación correlacionado (o característica del mismo) puede implicar entonces la referencia al registro escrito o fijo, o a un experimento comparador que confirma la correlación, etc. Tal experimento comparador se puede realizar simultáneamente con una evaluación del patrón de glucosilación (o característica del mismo), o puede ser un experimento pasado o futuro.

Glucano: Como se conoce en la técnica y se usa aquí, los “glucanos” son azúcares. Los glucanos pueden ser monómeros o polímeros de restos de azúcares, pero contienen típicamente al menos tres azúcares, y pueden ser lineales o ramificados. Un glucano puede incluir restos de azúcares naturales (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico, galactosa, manosa, fucosa, hexosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o azúcares modificados (por ejemplo, 2’-fluororribosa, 2’-desoxirribosa, fosfomanosa, 6’sulfo N-acetilglucosamina, etc.). El término “glucano” incluye homo- y heteropolímeros de restos de azúcares. El término “glucano” también engloba un componente de glucano de un glucoconjugado (por ejemplo, de una glucoproteína, glucolípido, proteoglucano, etc.). El término también engloba glucanos libres, incluyendo glucanos que se han escindido o liberado de otro modo de un glucoconjugado.

Preparación de glucano: La expresión “preparación de glucano”, como se usa aquí, se refiere a un conjunto de glucanos obtenidos según un método particular de producción. En algunos casos, la preparación de glucano se refiere a un conjunto de glucanos obtenidos a partir de una preparación de glucoproteína (véase la definición de preparación de glucoproteína más abajo).

Glucoconjugado: La expresión “glucoconjugado”, como se usa aquí, engloba todas las moléculas en las que al menos un resto de azúcar está enlazado covalentemente a al menos algún otro resto. El término engloba específicamente todas las biomoléculas con restos de azúcar unidos covalentemente, incluyendo, por ejemplo, glucoproteínas enlazadas mediante N, glucoproteínas enlazadas mediante O, glucolípidos, proteoglucanos, etc.

Glucoforma: El término “glucoforma” se usa aquí para referirse a una forma particular de un glucoconjugado. Esto es, cuando el mismo resto de cadena principal (por ejemplo, polipéptido, lípido, etc.) que es parte de un glucoconjugado tiene el potencial para enlazarse a diferentes glucanos o conjuntos de glucanos, entonces cada versión diferente del glucoconjugado (es decir, cuando la cadena principal está enlazada a un conjunto particular de glucanos) se denomina una “glucoforma”.

Glucolípido: El término “glucolípido”, como se usa aquí, se refiere a un lípido que contiene uno o más restos de azúcares enlazados covalentemente (es decir, glucanos). El resto o restos de azúcares pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. El resto o restos de azúcares pueden comprender una única cadena no ramificada de restos de azúcares, o puede comprender una o más cadenas ramificadas. En ciertos casos, los restos de azúcares pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. En ciertos casos, las glucoproteínas contienen restos de azúcares enlazados mediante O; en ciertos casos, las glucoproteínas contienen restos de azúcares enlazados mediante N.

Glucoproteína: Como se usa aquí, el término “glucoproteína” se refiere a una proteína que contiene una cadena principal peptídica enlazada covalentemente a uno o más restos de azúcares (es decir, glucanos). Como entienden los expertos en la técnica, la cadena principal peptídica comprende típicamente una cadena lineal de restos de aminoácidos. En ciertos casos, la cadena principal peptídica abarca toda la membrana celular, de manera que comprende una porción transmembránica y una porción extracelular. En ciertos casos, una cadena principal peptídica de una glucoproteína que abarca la membrana celular comprende una porción intracelular, una porción transmembránica, y una porción extracelular. En ciertos casos, los métodos de la presente descripción comprenden escindir una glucoproteína de la superficie celular con una proteasa para liberar la porción extracelular de la glucoproteína, o una porción de la misma, en los que tal exposición no rompe sustancialmente la membrana celular. El resto o restos de azúcares pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y/o polisacáridos. El resto o restos de azúcares pueden comprender una única cadena no ramificada de restos de azúcares, o pueden comprender una o más cadenas ramificadas. En ciertos casos, los restos de azúcares pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. Como alternativa, o adicionalmente, los restos de azúcares pueden incluir modificaciones de acetilo, glucolilo, propilo u otro alquilo. En ciertos casos, las glucoproteínas contienen restos de azúcares enlazados mediante O; en ciertos casos, las glucoproteínas contienen restos de azúcares enlazados mediante N. En ciertos casos, los métodos descritos aquí comprenden una etapa de analizar cualquiera o todas las glucoproteínas de la superficie celular, fragmentos liberados (por ejemplo, glucopéptidos) de glucoproteínas de la superficie celular, glucanos de la superficie celular unidos a glucoproteínas de la superficie celular, cadenas principales peptídicas de glucoproteínas de la superficie celular, fragmentos de tales glucoproteínas, glucanos y/o cadenas principales peptídicas, y sus combinaciones.

Preparación de glucoproteína: Una “preparación de glucoproteína”, como se usa ese término aquí, se refiere a un conjunto de moléculas de glucoproteína individuales, cada una de las cuales comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos particular (secuencia de aminoácidos la cual incluye al menos un sitio de glucosilación) y al menos un glucano covalentemente enlazado al al menos un sitio de glucosilación. Las moléculas individuales de una glucoproteína particular en una preparación de glucoproteína tienen típicamente secuencias de aminoácidos idénticas pero pueden diferir en la ocupación de los al menos un sitio de glucosilación y/o en la identidad de los glucanos enlazados a los al menos un sitio de glucosilación. Esto es, una preparación de glucoproteína puede contener sólo una única glucoforma de una glucoproteína particular, pero contiene más específicamente una pluralidad de glucoformas. Diferentes preparaciones de la misma glucoproteína pueden diferir en la identidad de glucoformas presentes (por ejemplo, una glucoforma que está presente en una preparación puede estar ausente en la otra) y/o en las cantidades relativas de las diferentes glucoformas.

Glucosidasa: El término “glucosidasa”, como se usa aquí, se refiere a un agente que escinde un enlace covalente entre azúcares secuenciales en un glucano, o entre el azúcar y el resto de la cadena principal (por ejemplo, entre el azúcar y la cadena principal peptídica de glucoproteína). En algunos casos, una glucosidasa es una enzima. En ciertos casos, una glucosidasa es una proteína (por ejemplo, una enzima proteica) que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En ciertos casos, una glucosidasa es un agente de escisión química.

Patrón de glucosilación: Como se usa aquí, la expresión “patrón de glucosilación” se refiere al conjunto de estructuras de glucano presentes en una muestra particular. Por ejemplo, un glucoconjugado particular (por ejemplo, glucoproteína) o conjunto de glucoconjugados (por ejemplo, conjunto de glucoproteínas) tendrá un patrón de glucosilación. En algunos casos, se hace referencia al patrón de glucosilación de glucanos de la superficie celular, o un “patrón de glucosilación de superficie”. Como se usa aquí, un “patrón de glucosilación de superficie” se puede referir al patrón de glucanos (o “patrón de glucosilación”) que existe en el dominio extracelular de una única glucoproteína de la superficie celular y/o glucolípido de interés. Adicionalmente, o como alternativa, un “patrón de glucosilación de superficie” se puede referir al patrón de glucanos (o “patrón de glucosilación”) que existe en el dominio extracelular de una pluralidad de glucoproteínas y/o glucolípidos de la superficie celular. En ciertos casos,

un “patrón de glucosilación de superficie” describe el patrón de glucanos (o “patrón de glucosilación”) que existe en todo el complemento de glucoproteínas y/o glucolípidos de la superficie celular. Basándose en el contexto, los expertos normales en la técnica entenderán fácilmente si el “patrón de glucosilación de superficie” se refiere al patrón de glucosilación de una única glucoproteína y/o glucolípido de la superficie celular, o al patrón de glucosilación de una pluralidad de glucoproteínas y/o glucolípidos de la superficie celular. Un patrón de glucosilación se puede caracterizar, por ejemplo, por las identidades de glucanos, cantidades (absolutas o relativas) de glucanos individuales o glucanos de tipos particulares, grado de ocupación de los sitios de glucosilación, etc., o combinaciones de tales parámetros.

N-glucano: El término “N-glucano”, como se usa aquí, se refiere a un polímero de azúcares que se ha liberado de un glucoconjugado pero que estaba enlazado primitivamente al glucoconjugado vía un enlace de hidrógeno (véase la definición de glucano enlazado mediante N más abajo).

Glucanos enlazados mediante N: Los glucanos enlazados mediante N son glucanos que están enlazados a un glucoconjugado vía un enlace de nitrógeno. Existe una clasificación diversa de glucanos enlazados mediante N, pero se basa típicamente en el pentasacárido central común $(Man)_3(GlcNAc)(GlcNAc)$.

O-glucano: El término “O-glucano”, como se usa aquí, se refiere a un polímero de azúcares que se ha liberado de un glucoconjugado pero que estaba primitivamente enlazado al glucoconjugado vía un enlace de oxígeno (véase la definición de glucano enlazado mediante O más abajo).

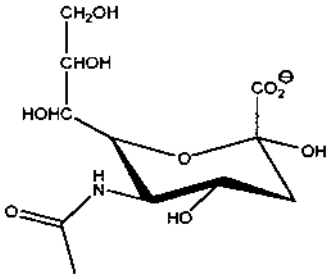
Glucanos enlazados mediante O: Los glucanos enlazados mediante O son glucanos que están enlazados a un glucoconjugado vía un enlace de oxígeno. Los glucanos enlazados mediante O están unidos típicamente a glucoproteínas vía N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) o vía N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) al grupo hidroxilo de L-serina (Ser) o L-treonina (Thr). Algunos glucanos enlazados mediante O también tienen modificaciones tales como acetilación y sulfatación. En algunos casos, los glucanos enlazados mediante O están unidos a glucoproteínas vía fucosa o manosa al grupo hidroxilo de L-serina (Ser) o L-treonina (Thr).

Fosforilación: Como se usa aquí, el término “fosforilación” se refiere al procedimiento de añadir covalentemente uno o más grupos fosfato a una molécula (por ejemplo, a un glucano).

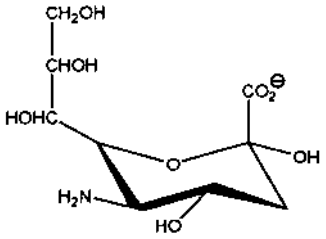
Proteasa: El término “proteasa”, como se usa aquí, se refiere a un agente que escinde un enlace peptídico entre aminoácidos secuenciales en una cadena polipeptídica. En algunos casos, una proteasa es una enzima (es decir, una enzima proteolítica). En ciertos casos, una proteasa es una proteína (por ejemplo, una enzima proteica) que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En ciertos casos, una proteasa es un agente de escisión química.

Proteína: En general, una “proteína” es un polipéptido (es decir, una secuencia de al menos dos aminoácidos enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir restos distintos de aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glucoproteínas), y/o se pueden procesar o modificar de otro modo. Los expertos normales en la técnica apreciarán que una “proteína” puede ser una cadena polipeptídica completa como se produce mediante una célula (con o sin una secuencia señal), o puede ser una porción funcional de la misma. Los expertos normales apreciarán además que una proteína puede incluir algunas veces más de una cadena polipeptídica, por ejemplo enlazada mediante uno o más enlaces de disulfuro, o asociada por otros medios.

Ácido siálico: La expresión “ácido siálico”, como se usa aquí, es una expresión genérica para los derivados *N*- u *O*-sustituidos del ácido neuramínico, un monosacárido de nueve carbonos. El grupo amino del ácido neuramínico posee típicamente un grupo acetilo o un grupo glucolilo en un ácido siálico. Los sustituyentes hidroxílicos presentes en el ácido siálico pueden modificarse mediante acetilación, metilación, sulfatación, y fosforilación. El ácido siálico predominante es ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Los ácidos siálicos imparten una carga negativa a glucanos, debido a que el grupo carboxilo tiende a disociar un protón a pH fisiológico. Los ácidos siálicos desprotonados ejemplares son como siguen:



Ácido N-acetilneuramínico (*Neu5Ac*)



Ácido neuramínico (*Neu*)

Sustancialmente: Como se usa aquí, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de mostrar un grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un expertos normales en técnicas biológicas

entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si lo hacen, llegan a su terminación y/o transcurren hasta la terminación o hasta lograr o evitar un resultado absoluto. El término “sustancialmente” se usa aquí por lo tanto para capturar la falta potencial de terminación inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos. Para dar sólo un ejemplo particular, cuando se afirma que un tratamiento no rompe “sustancialmente” las membranas celulares, se quiere decir que todas o la mayoría de las membranas celulares permanecen intactas durante y después del tratamiento, por ejemplo de manera que las glucoproteínas o glucopéptidos intracelulares no son liberados de este modo de las células. En ciertos casos, el término “sustancialmente”, como se aplica a membranas celulares no rotas, se refiere a una condición en la que 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos de las células sometidas a un tratamiento particular muestran membranas celulares rotas medibles. En ciertos casos, el término “sustancialmente”, como se aplica a membranas celulares sin romper, se refiere a una condición en la que ninguna de las células sometidas a un tratamiento particular muestra membranas celulares rotas medibles.

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

Como se describe aquí, la presente descripción se refiere a la detección de estructuras de glucano presentes en la superficie de células, cuya presencia, identidad y/o distribución (por ejemplo, cantidades relativas) revela información sobre el estado de la célula, por ejemplo información sobre el estado de glucosilación y/o características de una o más glucoproteínas no pertenecientes a la superficie celular producidas por las células. Esto es, en un caso de la descripción, los glucanos de la superficie celular actúan como un poder para la determinación de estructuras de glucanos y/o patrones de glucosilación encontrados en glucoproteínas no pertenecientes a la superficie celular. En algunos casos de la descripción, la glucoproteína no perteneciente a la superficie celular es una glucoproteína terapéutica. En algunos de tales casos, la célula se ha manipulado mediante ingeniería para expresar la glucoproteína terapéutica, y/o para expresar la proteína terapéutica a un nivel predeterminado o en condiciones predeterminadas.

Glucanos de la superficie celular

Muchos tipos diferentes de células glucosilan al menos algunas de las proteínas y/o lípidos que producen, y existen varios mecanismos diferentes para tal glucosilación. En general, sin embargo, las cadenas de oligosacáridos se enlazan a una cadena polipeptídica (es decir, a una proteína) y/o a un lípido en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi vía enlaces mediante N o enlaces mediante O.

Glucosilación enlazada mediante N

Típicamente, se añaden cadenas de oligosacáridos enlazadas mediante N a una proteína en la luz del retículo endoplásmico (véase Molecular Biology of the Cell, de Alberts et al., 1994). Específicamente, se añade un oligosacárido inicial (típicamente 14-azúcar) al grupo amino en la cadena lateral de un resto de asparagina contenido en la secuencia consenso diana de Asn-X-Ser/Thr, en el que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La estructura de este oligosacárido inicial es común para la mayoría de las eucariotas, y contiene 3 restos de glucosa, 9 restos de manosa, y 2 restos de N-acetilglucosamina. Esta cadena de oligosacárido inicial se recorta habitualmente mediante enzimas de glucosidasa específicas en el retículo endoplásmico, dando como resultado un oligosacárido central corto ramificado compuesto de dos restos de N-acetilglucosamina y tres restos de manosa.

Los N-glucanos se pueden subdividir en tres grupos distintos, denominados “tipo alto contenido de manosa”, “tipo híbrido”, y “tipo complejo”, apareciendo un núcleo de pentasacárido común (Man(alpha1,6)-(Man(alpha1,3))-Man(beta1,4)-GlcpNAc(beta1,4)-GlcpNAc(beta1,N)-Asn) en los tres grupos.

Después del procesamiento inicial en el retículo endoplásmico, la glucoproteína se transporta entonces al aparato de Golgi, donde puede tener lugar el procesamiento posterior. Si el glucano se transfiere al Golgi antes de que esté completamente recortado hasta la estructura de pentasacárido central, da como resultado un “glucano con alto contenido de manosa”.

Adicionalmente, o como alternativa, se pueden añadir una o más unidades de monosacárido de N-acetilglucosamina a las subunidades de manosa centrales para formar un “glucano complejo”. Se puede añadir galactosa a las subunidades de N-acetilglucosamina, y se pueden añadir subunidades de ácido siálico a las subunidades de galactosa, dando como resultado cadenas que terminan con cualquiera de un ácido siálico, una galactosa o un resto de N-acetilglucosamina. Adicionalmente, se puede añadir un resto de fucosa a un resto de N-acetilglucosamina del oligosacárido central. Cada una de estas adiciones está catalizada por glucosil transferasas específicas.

Los “glucanos híbridos” comprenden características tanto de glucanos con alto contenido de manosa como de glucanos complejos. Por ejemplo, una rama de un glucano híbrido puede comprender principalmente, o de forma exclusiva, restos de manosa, mientras que la otra rama puede comprender azúcares de N-acetilglucosamina, ácido siálico, galactosa, y/o fucosa.

Glucosilación enlazada mediante O

Las cadenas de oligosacárido enlazadas mediante O se añaden a restos específicos de serina o treonina en cadenas polipeptídicas. La transferencia del primer resto de azúcar, que en muchos casos es una N-

acetilgalactosamina, comienza típicamente en el retículo endoplásmico y termina en el aparato de Golgi. Los restos de un oligosacárido enlazado mediante O se añaden de uno en uno, y la adición de cada resto está catalizada por una enzima específica. En contraste con la glucosilación enlazada mediante N, la secuencia de aminoácidos de consenso para la glucosilación enlazada mediante O está menos definida.

Glucoproteínas diana

Se pueden aplicar técnicas de la presente descripción para evaluar el estado de glucosilación de cualquier glucoproteína no perteneciente a la superficie celular o de cualquier otra glucoproteína de interés distinta de aquella cuyos glucanos están siendo analizados directamente o producidos por una célula particular o población de células. La identidad de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular no está destinada a limitar la presente descripción. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se sabe que la célula o células producen una glucoproteína de interés particular (la glucoproteína "diana"), cuyo estado de glucosilación se va a evaluar.

En muchos casos, la glucoproteína diana de interés es aquella que no es producida de forma natural por la célula; más bien, la célula se ha manipulado para producirla. En algunos casos, la glucoproteína diana es aquella que es producida de forma natural por la célula, pero la célula se ha manipulado para producirla en un nivel elevado y/o en condiciones predeterminadas (por ejemplo, en presencia de un agente inductor, etc.).

En muchos casos, una glucoproteína diana tiene actividad terapéutica cuando se administra a animales (por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos). Para dar unos pocos ejemplos, las eritropoyetinas, los interferones, los factores de coagulación de la sangre, los factores estimulantes de colonias, una variedad de anticuerpos y ciertas enzimas son todos ellos glucoproteínas que se producen actualmente como agentes biofarmacéuticos en estirpes celulares manipuladas. En algunos casos de la presente descripción, los glucanos en la superficie de células que producen uno o más de estos agentes se evalúan como se describe aquí a fin de evaluar o monitorizar la glucosilación del agente. Un experto normal en la técnica estará al tanto de otras glucoproteínas comercialmente relevantes que se pueden expresar industrialmente (por ejemplo, en biorreactores de producción) con fines terapéuticos y otros fines. La presente descripción incluye métodos para monitorizar los patrones de glucosilación de tales glucoproteínas comercialmente relevantes.

Los productos de glucoproteína representativos comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo:

Producto proteico	Fármaco de referencia
interferón gamma-1b	Actimmune®
alteplasa; activador del plasminógeno de tejidos	Activase®/Cathflo®
factor antihemofílico recombinante	Advate
albúmina humana	Albutein®
laronidasa	Aldurazyme®
interferón alfa-N3, derivado de leucocitos humanos	Alferon N®
factor antihemofílico humano	Alphanate®
factor IX de coagulación humano filtrado de virus	AlphaNine® SD
Alefacept; proteína de fusión dímera recombinant, LFA3-Ig	Amevive®
bivalirudina	Angiomax®
darbepoetina alfa	Aranesp™
bevacizumab	Avastin™
interferón beta-1a; recombinante	Avonex®
factor IX de coagulación	BeneFix™
interferón beta-1b	Betaseron®
Tositumomab	Bexxar®
factor antihemofílico	Bioclate™
hormona del crecimiento humana	BioTropin™

Producto proteico	Fármaco de referencia
toxina botulínica tipo A	Botox®
Alemtuzumab	Campath®
acritumomab; marcado con tecnecio-99	CEA-Scan®
alglucerasa; forma modificada de beta-glucocerebrosidasa	Ceredase®
imiglucerasa; forma recombinante de beta-glucocerebrosidasa	Cerezyme®
Fab inmune polivalente de crotalidae, ovino	CroFab™
Fab inmune de digoxina, ovino	DigiFab™
rasburicasa	Elitek®
etanercept	Enbrel®
epoyetina alfa	Epogen®
cetuximab	Erbitux™
algasidasa beta	Fabrazyme®
urofolitropina	Fertinex™
folitropina beta	Follistim™
teriparatida	Forte®
somatropina humana	GenoTropin®
glucagón	GlucaGen®
folitropina alfa	Gonal-F®
factor antihemofílico	Helixate®
factor antihemofílico; Factor XIII	Hemofil®
insulina	Humalog®
complejo del factor antihemofílico/factor de von Willebrand - humano	Humate-P®
somatotropina	Humatrope®
adalimumab	HUMIRA™
insulina humana	Humulin®
hialuronidasa humana recombinante	Hylenex™
interferón alfacon-1	Infergen®
Eptifibatida	Integrilin™
alfa-interferón	Intron A®
Palifermin	Kepivance
anakinra	Kineret™
factor antihemofílico	Kogenate®FS
insulina glargina	Lantus®
factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Leukine®/Leukine® Líquido

Producto proteico	Fármaco de referencia
lutropina alfa, para inyección	Luveris
lipoproteína OspA	LYMErix™
ranibizumab	Lucentis®
gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg™
galsulfasa	Naglazyme™
nesiritida	Natrecor®
pegfilgrastim	Neulasta™
oprelvekin	Neumega®
filgrastim	Neupogen®
fanolesomab	NeutroSpec™ (formerly LeuTech®)
somatropina [rDNA]	Norditropin®/Norditropin Nordiflex®
insulina; suspensión de cinc	Novolin L®
insulina; suspensión de isofano	Novolin N®
insulina, normal;	Novolin R®
insulina	Novolin®
factor VIIa de coagulación	NovoSeven®
somatropina	Nutropin®
inmunoglobulina intravenosa	Octagam®
PEG-L-asparaginasa	Oncaspar®
abatacept, proteína de fusión humana completamente soluble	Orencia™
muromomab-CD3	Orthoclone OKT3®
gonadotropina coriónica humana	Ovidrel®
peginterferón alfa-2a	Pegasys®
versión pegilada de interferón alfa-2b	PEG-Intron™
Abarelix (suspensión inyectable); antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina	Plenaxis™
epoyetina alfa	Procrit®
aldesleucina	Proleukin, IL-2®
somatrem	Protropin®
dornasa alfa	Pulmozyme®
Efalizumab; bloqueador selectivo, reversible de células T	Raptiva™
combinación de ribavirina y alfa interferón	Rebetron™
Interferón beta 1a	Rebif®
factor antihemofílico	Recombinate®
rAHF/factor antihemofílico	ReFacto®

Producto proteico	Fármaco de referencia
lepirudina	Refludan®
infliximab	Remicade®
abciximab	ReoPro™
reteplasa	Retavase™
rituximab	Rituxan ™
interferón alfa-2a	Roferon-A®
somatropina	Saizen®
secretina porcina sintética	SecreFlo™
basiliximab	Simulect®
eculizumab	Soliris®
pegvisomant	Somavert®
Palivizumab; mAb humanizado, producido recombinantemente	Synagis™
tirotropina alfa	Thyrogen®
tenecteplasa	TNKase™
natalizumab	Tysabri®
disoluciones al 5% y al 10% intravenosas de globulina inmunitaria humana	Venoglobulin-S®
interferón alfa-n1, linfoblastoide	Wellferon®
drotrecogina alfa	Xigris™
Omalizumab; anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante dirigido contra inmunoglobulina-E	Xolair®
daclizumab	Zenapax®
ibritumomab tiuxetan	Zevalin™
Somatotropina	Zorbtive™ (Serostim®)

Como apreciarán los expertos normales en la técnica, los patrones de glucosilación de tales glucoproteínas terapéuticas pueden afectar potencialmente a sus propiedades terapéuticas. La presente descripción incluye tecnologías que permiten a los investigadores evaluar la glucosilación de estas proteínas a medida que son producidas en células sin necesitar el aislamiento de las propias proteínas. Como se explica más abajo adicionalmente, la presente descripción permite por lo tanto, entre otras cosas, evaluar en tiempo real la calidad del producto para productos de glucoproteína terapéuticos a medida que las glucoproteínas están siendo producidas.

Los expertos normales en la técnica apreciarán que la presente descripción no está limitada a la evaluación de la glucosilación en las glucoproteínas enumeradas anteriormente, o de hecho en glucoproteínas terapéuticas, o en glucoproteínas cuya expresión (y/o grado o tiempo de expresión) se ha manipulado en una célula. Éstas representan simplemente ciertos casos particulares de la presente descripción; los expertos normales en la técnica apreciarán, sin embargo, que los principios de la descripción se aplican a cualquier glucoproteína diana.

Producción de glucoproteínas diana en células

Los expertos normales en la técnica apreciarán fácilmente que las glucoproteínas cuya glucosilación se va a monitorizar como se describe aquí se pueden producir en cualquiera de una variedad de células y/o estirpes celulares. De hecho, cualquier célula que se glucosile en al menos algunas de sus proteínas se puede utilizar y hacer crecer en cualesquiera condiciones que permitan que se produzca tal glucosilación. Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, células aviares, células de peces, células de insectos, células vegetales, células fúngicas, células bacterianas, y células híbridas. En algunos casos, las células se han manipulado

(por ejemplo, genética y/o químicamente) para que tengan una o más características de glucosilación más similares a células humanas.

Las células de mamífero ejemplares que se pueden usar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK), células de riñón de hámster neonato (células BHK), células NSO, células MCF-7, células MDA-MB-438, células U87, células A172, células HL60, células A549, células SP10, células DOX, células DG44, células HEK 293, células SHSY5Y, Jurkat, células BCP-1, células COS, células Vero, células GH3, células 9L, 3T3, células MC3T3, células C3H-10T1/2, células NIH-3T3, células y células C6/36.

Las estirpes celulares de peces ejemplares que se pueden usar según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células ZF4, células AB9, células GAKS, células OLF-136, células CAEP, células CAF, células OLHE-131, células OLME-104, células ULF-23, células BRF41, células Hepa-E1, células Hepa-T1, células GEM-81, células GEM-199, células GEM-218, células GAKS, células D-11, células R1, células RTG-2, células RTO, y células TPS. En Fryer y Lannan, 2005, “Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes”, J. Tissue Culture Methods, 16: 87-94, se puede encontrar una lista más completa.

Las estirpes celulares de insectos ejemplares que se pueden usar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, células SFM, células Sf21, células Sf9, células de Schneider, células S2, células T.ni, células SES-MaBr-1, células SES-MaBr-3, células NIAS-MB-25, células NIAS-MaBr-92, células FRI-SpIm-1229, células SES-MaBr-4, células NIAS-LeSe-11, células TUAT-SpLi-221, células NIAS-PX-64, células NIAS-MB-32, células NIAS-MaBr-93, células SES-MaBr-5, células BM-N, células NIAS-PX-58, células MBHL-2, y células MBHL-3.

Los expertos normales en la técnica reconocerán que esto es un listado ejemplar, no exhaustivo, de diversas células que se pueden usar según la presente descripción. Se pueden utilizar ventajosamente otras células para producir una glucoproteína diana. Tales células pueden estar en cultivo o en el contexto de un tejido, órgano u organismo.

Los expertos en la técnica también apreciarán que se puede usar una variedad de sistemas y vectores de expresión a fin de expresar una proteína de interés en células o estirpes celulares usadas según la presente descripción (por ejemplo, véase Molecular cloning: A Laboratory Manual, Ed. por Sambrook, CSHL Press, 2002).

También, se puede usar según la presente descripción cualquiera de una variedad de medios de cultivo celular, incluyendo medios complejos y/o medios de cultivo libres de suero, que son capaces de apoyar el crecimiento de uno o más tipos celulares o estirpes celulares. Típicamente, un medio de cultivo celular consiste en un tampón, sales, fuente de energía, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, etc.), vitaminas y/u oligoelementos. Los medios de cultivo celulares pueden contener opcionalmente una variedad de otros ingredientes, incluyendo, pero sin limitarse a, fuentes de carbono (por ejemplo, azúcares naturales, azúcares no naturales, etc.), cofactores, lípidos, azúcares, nucleósidos, componentes derivados de animales, hidrolizados, hormonas/factores de crecimiento, tensioactivos, indicadores, minerales, activadores/inhibidores de enzimas específicas, y orgánicos (por ejemplo, butirato, que induce apoptosis, que libera glucosilasas, a menudo ralentiza la velocidad de crecimiento de la célula, que cambia los niveles de glucosiltransferasa, lo que puede dar como resultado una glucosilación más madura y da como resultado un cambio en la energía de la célula; cloroquina, que afecta al pH intracelular; betaína, un osmoprotector; amoníaco, que altera los niveles de pH intracelular y que puede cambiar la eficiencia de glucosil transferasa; etc.), y/o metabolitos de tipo pequeña molécula (por ejemplo, CMP-ácido siálico, glucosamina, derivados de azúcares no naturales, etc.). Los medios de cultivo celular adecuados para uso según la presente descripción están comercialmente disponibles de una variedad de fuentes, por ejemplo ATCC (Manassas, Va).

En ciertos casos, se usa uno o más de los siguientes medios para hacer crecer células: medio RPMI-1640, medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio esencial mínimo de Eagle, medio F-12K, medio de Dulbecco modificado de Iscove. Como entenderán los expertos normales en la técnica, cuando se usa un medio definido que está libre de suero y/o libre de peptona, el medio está típicamente muy enriquecido en aminoácidos y oligoelementos (véanse, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.122.469 de Mather et al., y la patente U.S. nº 5.633.162 de Keen et al.).

Diferentes medios de cultivo celular pueden afectar al patrón de glucosilación de glucoproteínas expresadas en los medios. Por ejemplo, un medio de cultivo celular dado puede dar como resultado la producción de glucoproteínas con un patrón de glucosilación incrementada, un patrón de glucosilación disminuida, o una glucosilación alterada (por ejemplo, que representa un incremento en ciertos glucanos y una disminución en otros). Un experto normal en la técnica estará al tanto y será capaz de escoger uno o más medios de cultivo celular adecuados para uso en el crecimiento de células cuyos glucanos de la superficie celular se han de analizar usando ciertos métodos de la presente descripción.

En algunos casos, las células se cultivan en cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo de perfusión, suspensión estática (por ejemplo, botellas giratorias, matraces en T, microportadores, T150, etc.), y/o en agitadores.

Las células que producen al menos una glucoproteína no perteneciente a la superficie celular (es decir, glucoproteína diana) según la presente invención se pueden hacer crecer en cualquiera de una variedad de condiciones de cultivo celular.

En algunos casos, las células se cultivan en condiciones de cultivo celular de manera que se espera que la glucoproteína diana muestre un patrón deseado de glucosilación. En algunos casos, una o más condiciones de cultivo celular se controlan y/o modifican a fin de producir la glucoproteína diana con patrones de glucosilación más deseables. Tales condiciones de cultivo celular que se pueden controlar o modificar incluyen, pero no se limitan a, pH, niveles de CO_2, niveles de oxígeno, velocidad de agitación del cultivo, condiciones redox, temperatura del cultivo, densidad celular, densidad del cultivo de semillas, duración del cultivo, diseño del reactor, velocidad de rociado, y/u osmolaridad.

Si se desea, para aislar células del medio de cultivo celular, se puede usar cualquiera de una variedad de métodos. En ciertos casos, las células se hacen crecer en un cultivo en suspensión. En tales casos, las células se pueden purificar del medio de cultivo celular mediante uno o más ciclos de centrifugación y lavado (por ejemplo, con disoluciones de lavado fisiológicas adecuadas tales como disolución salina tamponada con fosfato).

En ciertos casos, las células se hacen crecer en un cultivo de adhesión. En tales casos, las células se pueden purificar del medio de cultivo celular liberándolas en primer lugar a partir de la superficie del cultivo. Por ejemplo, las células se pueden liberar de la superficie del cultivo sometiéndolas a EDTA. Los expertos normales en la técnica estarán al tanto de otros agentes adecuados que se pueden usar para liberar células adherentes desde la superficie de cultivo. Tras la liberación, las células se pueden purificar mediante uno o más ciclos de centrifugación y lavado (por ejemplo, con disoluciones de lavado fisiológicas adecuadas tales como disolución salina tamponada con fosfato). En cuanto a las células que se hacen crecer en cultivo en suspensión, se debería tener cuidado de no centrifugar las células con demasiada fuerza, a fin de evitar la ruptura celular innecesaria.

Análisis de glucanos de la superficie celular

Para detectar glucanos sobre una superficie celular según la presente invención, se puede utilizar cualquier técnica adecuada. Los glucanos se pueden detectar y/o analizar en células, por ejemplo mientras todavía forman parte de una glucoproteína producida por una célula. Por ejemplo, en ciertos casos, los glucanos se detectan y/o analizan en células en ausencia de tratamiento con proteasas o glucosidasas. Como alternativa, o adicionalmente, los glucanos se pueden liberar de las células y después detectar y/o analizar. Los glucanos se pueden liberar de las células sometiendo a las células a una o más proteasas, glucosidasas, o a ambas. Por ejemplo, un glucopéptido se puede liberar de una célula sometiendo a la célula a una o más proteasas, tales como, sin limitación, proteasas descritas aquí, glucopéptido liberado el cual se somete a una o más glucosidasas, tales como, sin limitación, glucosidasas descritas aquí. Como otro ejemplo no limitante, los glucanos se pueden liberar directamente de la célula sometiendo a la célula a tratamiento con glucosidasas, sin someter a la célula a tratamiento con proteasas. Más abajo se indican ciertas técnicas analíticas representativas con más detalle, pero no están destinadas a limitar el alcance de la presente descripción.

Liberación de glucopéptidos

En ciertos casos de la presente descripción, una etapa implicada en el análisis de glucanos de la superficie celular es la liberación de tales glucanos a partir de la superficie de la célula. Entre las diversas ventajas ofrecidas por tales casos está el hecho de que se puede obtener una población muy pura de glucanos de la superficie celular sin la contaminación significativa por glucanos que se encuentran principalmente en el interior de la célula. Por ejemplo, usando ciertos métodos de la presente descripción, se evita sustancialmente la lisis de células cuando los glucanos de la superficie celular son liberados de la célula. Adicionalmente, o como alternativa, ciertos métodos descritos aquí ofrecen reducciones significativas en el número y/o dificultad de manipulación de las etapas en comparación con los métodos actualmente disponibles.

En ciertos casos, las glucoproteínas de la superficie celular son liberadas desde la superficie celular sometiendo a la célula a una o más proteasas. Las proteasas escinden los enlaces de amida en una cadena polipeptídica. Existen varias clases de proteasas, incluyendo agentes tanto químicos como enzimáticos. Las enzimas proteolíticas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, ácido aspártico proteasas, metaloproteasas, y ácido glutámico proteasas. Los ejemplos no limitantes de enzimas proteolíticas específicas que se pueden usar según la presente descripción incluyen tripsina, quimiotripsina, elastasa, subtilisina, proteinasa K, pepsina, ficina, bromelina, plasmepsina, renina, quimiosina, papaína, una catepsina (por ejemplo catepsina K), una caspasa (por ejemplo CASP3, CASP6, CASP7, CASP14), calpaína 1, calpaína 2, hermolisina, carboxipeptidasa A o B, metaloproteinasa de la matriz, una ácido glutámico proteasa, y/o sus combinaciones. Los expertos normales en la técnica estarán al tanto de que se puede usar un número de otras proteasas según la presente descripción para liberar una glucoproteína a partir de la superficie de una célula.

Los métodos actuales para analizar glucoproteínas celulares, incluso cuando se señala explícitamente que están dirigidos a glucanos de la superficie celular, típicamente no son particularmente selectivos para los glucanos de la superficie celular. Por ejemplo, los métodos actuales emplean típicamente uno o más detergentes agresivos para extraer proteínas de la membrana, después de lo cual los azúcares libres son eliminados mediante diálisis antes del tratamiento con agentes que eliminan estructuras de glucano a partir de proteínas o polipéptidos. En tales condiciones, las preparaciones de glucano están contaminadas por glucanos intracelulares, por ejemplo procedentes del retículo endoplásmico y/o del aparato de Golgi. Tales glucanos intracelulares son típicamente glucanos

inmaduros con contenido elevado de manosa. De este modo, su inclusión puede sesgar el análisis de las estructuras de glucano asociadas con glucoproteínas de la superficie celular.

En algunos casos de la presente descripción, el análisis de glucanos de la superficie celular implica el uso de detergentes para liberar glucoproteínas de la superficie celular a partir de las membranas. En algunos casos de la presente descripción, sin embargo, el tratamiento con detergentes se minimiza o evita por completo a favor de estrategias que minimizan la interrupción de la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de las membranas celulares permanecen intactas (por ejemplo, según se monitoriza mediante exclusión con azul de tripán). Tales métodos son ventajosos, entre otras cosas, debido a que pueden reducir o eliminar la contaminación procedente de glucoproteínas inmaduras con contenido elevado de manosa, que están presentes en el interior de la célula.

En ciertos casos de la presente descripción, los glucanos (en forma de glucopéptidos) son liberados de una superficie celular sometiendo a la célula a una o más proteasas. En ciertos casos, las células se someten a una o más proteasas en condiciones que minimizan la interrupción de la membrana celular. En algunos casos de la descripción, los glucanos son liberados a partir de una superficie celular sometiendo a la célula a una o más proteasas durante un período de tiempo limitado, a fin de evitar la lisis sustancial de la membrana celular. En ciertos casos, una célula se somete a una o más proteasas durante un tiempo suficientemente limitado de manera que no se produzca la lisis sustancial de la membrana celular.

Por ejemplo, una célula se puede someter a una o más proteasas durante un período de tiempo que es menor que alrededor de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 minuto. En ciertos casos, una célula se somete a una o más proteasas durante un período de tiempo que es mayor que 15 minutos en tanto que no se produzca la lisis sustancial de la membrana celular. Por ejemplo, se puede emplear una concentración suficientemente baja de proteasa o proteasas, una temperatura suficientemente baja y/o cualquiera de una variedad de otros factores o condiciones de manera que la actividad global de las proteasas disminuya hasta un punto en el que no se produzca la lisis sustancial de la membrana celular. Los expertos normales en la técnica estarán al tanto y serán capaces de emplear factores o condiciones que aseguren que no se produce la lisis sustancial de la membrana celular.

En ciertos casos de la presente descripción, al menos alrededor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de los glucanos de la superficie celular son liberados de las células, por ejemplo mediante tratamiento con una proteasa. Para dar sólo un ejemplo específico, la presente descripción demostró, por ejemplo, que la escisión con tripsina durante 15 min. a 37ºC da como resultado la liberación de más de 50% de los glucanos de la superficie celular.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo a una célula a una o más proteasas (por ejemplo, enzimas proteolíticas) a una concentración de al menos alrededor de 0,1 mg/ml. En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo una célula a una o más proteasas (por ejemplo, enzimas proteolíticas) a una concentración menor que alrededor de 2,0 mg/ml. En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo una célula a una o más proteasas (por ejemplo, enzimas proteolíticas) a una concentración de alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 mg/ml o mayor.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo una célula a una pluralidad de proteasas. Por ejemplo, una célula se puede someter a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más proteasas para liberar los glucanos de la superficie celular. Tal pluralidad de proteasas se puede administrar a la célula simultáneamente y/o secuencialmente. En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo una célula a una pluralidad de proteasas simultáneamente, después de lo cual los glucanos liberados (en forma de glucopéptidos) se purifican de la célula.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados sometiendo una célula a una primera proteasa (o pluralidad de primeras proteasas) durante un primer período de tiempo, después de lo cual la célula se somete a una segunda proteasa (o pluralidad de segundas proteasas) durante un segundo período de tiempo. Antes del tratamiento con la segunda proteasa, la primera proteasa se puede eliminar y/o inactivar opcionalmente. A título de ejemplo, la primera proteasa se puede inactivar incubando la proteasa a una temperatura durante un tiempo suficiente para inactivarla. Adicionalmente, o como alternativa, la primera proteasa se puede inactivar incubándola con un inhibidor que es específico para la proteasa (por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula que se une específicamente a la primera proteasa e inhibe su actividad catalítica). Otros métodos para inactivar la primera proteasa serán conocidos por los expertos normales en la técnica. En el caso en el que la primera proteasa sea inactivada al incubarla con un inhibidor específico, se apreciará que la presencia del inhibidor no debería inhibir sustancialmente la actividad de la segunda proteasa.

En ciertos casos, la proteasa o proteasas se eliminan y/o inactivan antes de la liberación de glucanos. A título de ejemplo, una proteasa se puede inactivar incubando la proteasa a una temperatura durante un tiempo suficiente para inactivarla. Como alternativa, o adicionalmente, una proteasa se puede inactivar incubándola con un inhibidor o anticuerpo u otra molécula que se une específicamente a la proteasa e inhibe su actividad catalítica.

Liberación de glucanos

En ciertos casos de la presente descripción, los glucanos de la superficie celular se escinden antes de ser analizados. Por ejemplo, en ciertos casos, una o más estructuras de glucano se escinden de los glucopéptidos de la superficie celular después de que los glucopéptidos de la superficie celular han sido liberados de la célula (por ejemplo, mediante tratamiento con proteasas, como se describe con más detalle anteriormente). En ciertos casos, una o más estructuras de glucano se escinden de glucoproteínas de la superficie celular que no se han liberado de la célula.

En ciertos casos, una o más estructuras de glucano se liberan mediante el uso de una enzima o pluralidad de enzimas que reconocen y escinden las estructuras de glucano. Según la presente descripción, se puede usar cualquiera de una variedad de enzimas glucosídicas y otras enzimas que escinden estructuras de glucano a partir de glucoproteínas de la superficie celular. En R.A. O'Neill, Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis, J. Chromatogr. A 720, 201-215. 1996; y S. Prime, et al., Oligosaccharide sequencing based on exo- and endo-glycosidase digestion and liquid chromatographic analysis of the products, J. Chromatogr. A 720, 263-274, 1996 se repasan varios ejemplos de tales enzimas. En ciertos casos, la enzima PNGasa F (N-glucosidasa peptídica F) se usa para eliminar glucanos de un glucopéptido o glucoproteína. La PNGasa F es una amidasa que escinde el enlace de amida entre GlcNAc más interno y los restos de asparagina de oligosacáridos con alto contenido de manosa, híbridos, y complejos, procedentes de glucoproteínas enlazadas mediante N. Adicionalmente, o como alternativa, en ciertos casos, para eliminar glucanos se usan las enzimas PNGasa A, O-glucanasa, y/o Endo-H.

Para mejorar la accesibilidad del sitio de glucosilación a una enzima de escisión, la mayoría de las glucoproteínas requiere una etapa de desnaturalización proteica. Típicamente, esto se logra usando detergentes (por ejemplo, SDS) y/o agentes reductores de disulfuro (por ejemplo, beta-mercaptoetanol), aunque los métodos para desnaturalizar una glucoproteína para uso según la presente descripción no están limitados al uso de tales agentes. Por ejemplo, la exposición a temperatura elevada puede ser suficiente para desnaturalizar una glucoproteína, de manera que una enzima adecuada para escindir estructuras de glucano es capaz de acceder al sitio de escisión. En ciertos casos, una glucoproteína se desnaturaliza incubando la glucoproteína a una temperatura de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 grados Celsius, o mayor, durante un período de tiempo suficiente para desnaturalizar la glucoproteína.

En ciertos casos, para desnaturalizar una glucoproteína se emplea una combinación de detergentes, agentes reductores de disulfuro, temperatura elevada, y/u otros agentes o condiciones de reacción. Aquellos expertos normales en la técnica estarán al tanto de las condiciones adecuadas, tiempos de incubación, etc., que serán suficientes para desnaturalizar una glucoproteína. Se señala que los oligosacáridos situados en sitios Fc conservados en inmunoglobulina G (IgG) son fácilmente escindibles por PNGasa F. De este modo, típicamente no se requiere una etapa de desnaturalización proteica para moléculas de IgG cuando se usa esta enzima. PNGasa F también es capaz de eliminar oligosacáridos en disolución diluida de hidróxido amónico, es estable en urea 2,5M a 37ºC durante 24 h, y todavía posee 40% de su actividad en urea 5M. De este modo, PNGasa F tiene la ventaja de que es capaz de escindir glucanos a partir de glucoproteínas en ciertas condiciones de desnaturalización.

Otras enzimas adecuadas que se pueden usar para escindir estructuras de glucano a partir de glucoproteínas según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, PNGasa A, O-glucanasa y/o Endo-H. Aquellos expertos normales en la técnica estarán al tanto de otras enzimas adecuadas para la escisión de glucanos a partir de glucoproteínas. En ciertos casos, para escindir estructuras de glucano a partir de una glucoproteína, se usa una pluralidad de enzimas. En ciertos casos, tal pluralidad de enzimas de escisión se administran simultáneamente. En ciertos casos, tal pluralidad de enzimas de escisión se administra secuencialmente.

En ciertos casos, una o más estructuras de glucano se escinden de glucoproteínas de la superficie celular mediante el uso de un agente distinto de una enzima. En ciertos casos, para escindir estructuras de glucano a partir de glucoproteínas, se puede usar un agente químico o una pluralidad de agentes químicos (por ejemplo, exposición a un agente tal como hidrazina, borohidruro de sodio, endoglucosidasas, ácido trifluorometanosulfónico (TFMS), y/o beta-eliminación, etc.). Por ejemplo, para escindir estructuras de glucano se ha empleado con éxito el uso de la hidrazina química. Como otro ejemplo no limitante, se ha sugerido que se puede usar una mezcla de amoníaco-carbonato de amonio para la liberación alcalina tanto de oligosacáridos enlazados mediante N como oligosacáridos enlazados mediante O en su forma nativa (véase Y. Huang, et al., Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis, Anal. Chem. 73, 6063-60, 2001). Aquellos de pericia normal en la técnica estarán al tanto de otros agentes químicos adecuados que se pueden usar según la presente descripción. En algunos casos, el uso de un agente químico para escindir estructuras de glucano a partir de una glucoproteína da como resultado la degradación proteica así como la escisión. Sin embargo, después de la escisión, la estructura de glucano se purifica a menudo del componente proteico de la glucoproteína antes del análisis y/o caracterización. En tales situaciones, la degradación del componente proteico tras el tratamiento con un agente químico no es perjudicial para la práctica de la presente descripción. En algunos casos, la degradación del componente proteico puede incluso ayudar en el procedimiento de purificación de la estructura o estructuras de glucano escindidas.

En algunos casos, los glucanos que se han liberado a partir de una glucoproteína y/o se han liberado a partir de una superficie celular se pueden digerir con una o más exoglucosidasas, y se puede analizar la estructura y/o composición de los productos de la digestión.

Las exoglucosidasas son enzimas que escinden enlaces glucosídicos terminales a partir del extremo no reductor de glucanos. Son típicamente muy específicas para enlaces de monosacáridos particulares y anomericidad (α/β). En algunos casos, los patrones de ramificación vecinos pueden afectar a la especificidad de la exoglucosidasa. El tratamiento con exoglucosidasas da habitualmente como resultado que los glucanos de los enlaces de tipo antena estándar se escindan hasta el núcleo de pentasacárido (M3N2) que contiene 3 restos de manosa y 2 restos de glcNAc. Sin embargo, las especies modificadas de forma no habitual (*por ejemplo* especies fucosiladas de tipo antena, glucanos con contenido elevado de manosa y glucanos híbridos, glucanos extendidos con lactosamina, glucanos sulfatados o fosforilados, etc.) son resistentes al tratamiento con exoglucosidasas, y se pueden resolver cromatográficamente y cuantificar con relación al pentasacárido M3N2.

En algunos casos, las exoglucosidasas usadas según la presente descripción reconocen y escinden solamente un tipo particular de enlace glucosídico. En algunos casos, las exoglucosidasas usadas según la presente descripción reconocen y escinden más de un tipo particular de enlace glucosídico. Las exoglucosidasas ejemplares que se pueden usar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa, fucosidasa, y manosidasa. Las exoglucosidasas se pueden obtener de cualquier fuente, incluyendo fuentes comerciales (*por ejemplo*, a partir de QA-Bio, ProZyme, Roche, Sigma, NEB, EMD, Glyko, *etc.*). Como alternativa, o adicionalmente, las exoglucosidasas se pueden aislar y/o purificar a partir de una fuente celular (*por ejemplo* bacterias, levaduras, plantas, *etc.*).

En algunos casos, las exoglucosidasas (*por ejemplo* sialidasas, galactosidasas, hexosaminidasas, fucosidasas, y manosidasas) se pueden dividir en múltiples categorías o "subconjuntos". En algunos casos, los diferentes subconjuntos presentan diferentes capacidades para escindir diferentes tipos de enlaces. La Tabla 1 presenta algunas exoglucosidasas ejemplares, sus especificidades por los enlaces, y el organismo a partir del cual derivan. Un experto normal en la técnica apreciará que ésta es una lista ejemplar, aunque no exhaustiva, de exoglucosidasas, y que se puede usar según la presente descripción cualquier exoglucosidasa que tenga cualquier especificidad por un enlace.

Tabla 1. Exoglucosidasas

Clase de enzima	EC #*	Actividad	Organismo
α-Sialidasa	3.2.1.18	α-2/3,6,8 (habitualmente no específica del enlace)	*Arthrobacter ureafaciens* *Vibrio cholerae* *Clostridium perfringens*
		α-2,3 (NeuAc procedente de oligosacáridos)	*Salmonella typhimurum* *Streptococcus pneumonia*
		α-2/3,6 (NeuAc procedente de complejo)	*Clostridium perfringens*
β-Galactosidasa	3.2.1.23	Enlaces β-1/3,4,6 Gal	Testículos bovinos especie *Xanthamonas* especie *Streptococcus* *E. coli*
		Enlaces β-1/4,6 Gal	Frijol machete
		Enlaces β-1,4 Gal	*Streptococcus pneumonia*
		Enlaces β-1,3-Gal	*E. coli* especie *Xanthomonas*
		Enlaces β-1/3,6-Gal	especie *Xanthomonas* *E. coli*
β-Hexosaminidasa	3.2.1.52 3.2.1.30	β-1/2,3,4,6 hexosaminas	*Streptococcus plicatus* *Streptococcus pneumonia* *Bacteroides* Frijol machete
α-Fucosidasa	3.2.1.51 3.2.1.111	α-1-3,4-Fuc (habitualmente desglucosila la estructura de Lewis)	*Xanthomonas* Harina de almendras
		α-1/2,3,4,6-Fuc (habitualmente tiene amplia especificidad)	Riñón bovino *C. meningosepticum*
		α-1,6-Fuc	*E. coli*
		α-1,2-Fuc	*Xanthomonas*
α-Manosidasa	3.2.1.24	α-1/2,3,6-Man	Frijol machete
		α-1/2,3-Man	*Xanthomonas manihotis*
		α-1,6-Man (típicamente una manosidasa central)	especie *Xanthomonas*
		α-1,2-Man	*Aspergillus saitoi*
β-Manosidasa	3.2.1.25	α-1,4-Man	*Helix pomatia*

Clase de enzima	EC #*	Actividad	Organismo
* "EC #" se refiere al número de registro de la Comisión de Enzimas			

Según la presente descripción, los glucanos que se han liberado de una glucoproteína y/o una superficie celular se pueden digerir con cualquier exoglucosidasa. En ciertos casos, los glucanos se digieren sometiendo una población de glucanos a una pluralidad de exoglucosidasas. Por ejemplo, una población de glucanos se puede someter a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más exoglucosidasas. En algunos casos, se administran simultáneamente múltiples exoglucosidasas. En algunos casos, se administran secuencialmente múltiples exoglucosidasas. En algunos casos, variando la identidad de las exoglucosidasas que se administran se revela información sobre la estructura de glucano y/o composición. En algunos casos, la variación de la secuencia en la que se administran múltiples exoglucosidasas revela información sobre la estructura y/o composición del glucano.

En algunos casos, la digestión secuencial con múltiples exoglucosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de glucano, que es diferente de la información revelada por la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglucosidasas. En algunos casos, la digestión secuencial con múltiples exoglucosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de glucano, que es la misma información revelada por la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglucosidasas. Para una discusión más completa de la utilidad de la digestión con exoglucosidasas en el análisis de la estructura de glucano, véase la solicitud de patente provisional U.S. en trámite junto con la presente, U.S.S.N. 60/923.688, presentada el 16 de abril de 2007, de Parsons et al., titulada "CARACTERIZACIÓN DE N-GLUCANOS USANDO EXOGLUCOSIDASAS".

Análisis de glucanos

Los glucanos se pueden analizar mediante cualquier técnica, incluyendo, por ejemplo, unión a ligandos, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, y/u otras metodologías. En la técnica se conoce una variedad de métodos para analizar glucanos. Por ejemplo, véanse Anumula, Anal. Biochem, 350(1):1-23, 2006; Klein et al. Anal. Biochem., 179:162-66, 1989; y Townsend, R R, Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, ed. Z. El Rassi, p. 181-209, 1995, Yuan et al., J. Chromatography A (2005) 1067:145-152.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular son liberados a partir de la célula antes de analizar su estructura (por ejemplo, vía tratamiento con proteasas y/o glucosidasas tales como las descritas anteriormente). El patrón de glucosilación de las glucoproteínas de la superficie celular liberadas se puede analizar mediante uno o más de una variedad de métodos. Como ejemplos no limitantes, los patrones de glucosilación de glucanos de la superficie celular liberados se pueden caracterizar mediante métodos tales como RMN, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos, cromatografía bidimensional, SDS-PAGE, tinción con anticuerpos, tinción con lectina, cuantificación de monosacáridos, electroforesis capilar, electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos (FACE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), tratamientos con exoglucosidasas o endoglucosidasas, y sus combinaciones. Aquellos expertos normales en la técnica estarán al tanto de otros métodos que se pueden usar para caracterizar glucanos de la superficie celular liberados.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular no se liberan a partir de la célula antes de analizar su estructura. El patrón de glucanos de la superficie celular que están unidos a la superficie celular se puede analizar mediante uno o más de una variedad de métodos.

Como ejemplos no limitantes, los glucanos de la superficie celular se pueden caracterizar por métodos tales como unión a anticuerpos, unión a lectina, y sus combinaciones. La unión de un anticuerpo, lectina u otro agente que reconoce una o más estructuras de glucano específicas, se puede monitorizar mediante cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, inmunofluorescencia, quimioluminiscencia, ensayos de ELISA, citometría de flujo, etc. Aquellos de pericia normal en la técnica estarán al tanto de otros métodos que se pueden usar para caracterizar patrones de glucosilación de glucanos de la superficie celular en la superficie de células.

En ciertos casos, los glucanos de la superficie celular se analizan liberándolos de las células, purificándolos y analizándolos después. Por ejemplo, en algunos casos, tales glucanos se caracterizan por métodos tales como métodos cromatográficos, métodos de espectroscopía de masas, métodos electroforéticos, métodos de resonancia magnética nuclear (RMN), y sus combinaciones. Por ejemplo, en algunos casos, los glucanos se caracterizan mediante uno o más de RMN, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos, cromatografía bidimensional, SDS-PAGE, tinción con anticuerpos, tinción con lectina, cuantificación de monosacáridos, electroforesis capilar, electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos (FACE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), tratamientos con exoglucosidasas o endoglucosidasas, y sus combinaciones.

En algunos casos, la estructura y composición de *N*-glucanos se puede analizar por métodos cromatográficos, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de líquidos (LC), cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC), cromatografía de líquidos de ultraprestaciones (UPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía con columna de amida, y sus combinaciones.

En algunos casos, la estructura y composición de N-glucanos se puede analizar mediante espectrometría de masas (MS) y métodos relacionados, incluyendo, pero sin limitarse a, MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS), espectrometría de masas con transformada de Fourier (FTMS), separación mediante movilidad de iones con espectrometría de masas (IMS-MS), disociación por transferencia de electrones (ETD-MS), y sus combinaciones.

En algunos casos, la estructura y composición de N-glucanos se puede analizar mediante métodos electroforéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, electroforesis capilar (CE), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) seguido de transferencia Western usando anticuerpos que reconocen estructuras específicas de glucanos, y sus combinaciones.

En algunos casos, la estructura y composición de los N-glucanos se puede analizar mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y métodos relacionados, incluyendo, pero sin limitarse a, RMN unidimensional (1D-NMR), RMN bidimensional (2D-NMR), RMN de giro de ángulo magnético de espectroscopía de correlación (COSY-NMR), RMN de espectroscopía correlacionada total (TOCSY-NMR), RMN de coherencia de un solo cuanto heteronuclear (HSQC-NMR), coherencia de múltiples cuantos heteronuclear (HMQC-NMR), RMN de espectroscopía de efecto Overhauser nuclear rotacional (ROESY-NMR), espectroscopía de efecto Overhauser nuclear (NOESY-NMR), y sus combinaciones.

Aquellos de pericia normal en la técnica estarán al tanto de otros métodos que se pueden usar para caracterizar patrones de glucosilación de glucoproteínas de la superficie celular liberadas.

En ciertos casos, las estructuras de glucoproteínas y/o glucanos de la superficie celular se marcan antes de la caracterización. Como es conocido por los expertos normales en la técnica, tal marcaje puede incrementar la señal y/o reducir el ruido de fondo durante la caracterización. Se puede usar cualquiera de una variedad de marcadores según la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a, marcadores fluorescentes, radiomarcadores y/o marcadores quimioluminiscentes. En ciertos casos, las estructuras de glucano se marcan con 2-aminobenzamida (“2-AB”) fluorescente. Aquellos de pericia normal en la técnica estarán al tanto de otros marcadores adecuados que se pueden usar según la presente descripción.

Aplicaciones

Se apreciará que las técnicas descritas aquí se pueden utilizar en cualquiera de una variedad de aplicaciones. En general, estas técnicas son útiles en cualquier aplicación que implique la caracterización estructural de glucanos, y es particularmente útil cuando es deseable caracterizar glucanos asociados con un glucoconjugado diana (por ejemplo, glucoproteína) pero el aislamiento del glucoconjugado diana consume tiempo o es muy laborioso o plantea otros retos (por ejemplo, asociados con la inestabilidad del glucoconjugado, etc.).

Los métodos de la presente descripción se pueden aplicar a glucanos obtenidos de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, formulaciones terapéuticas y muestras biológicas (por ejemplo, que contienen células). Tal muestra biológica puede sufrir uno o más análisis y/o etapas de purificación antes o después de ser analizada según la presente descripción. Para dar sólo unos pocos ejemplos, en algunos casos, una muestra biológica se trata con una o más proteasas y/o glucosidasas (por ejemplo, de manera que se liberen los glucanos); en algunos casos, los glucanos de la superficie celular en una muestra biológica se marcan con uno o más marcadores detectables u otros agentes que pueden facilitar el análisis, por ejemplo mediante espectrometría de masas o RMN. Cualquiera de una variedad de etapas de separación y/o aislamiento se puede aplicar a una muestra biológica según la presente descripción.

La presente descripción se puede utilizar para analizar glucanos de la superficie celular en cualquiera de una variedad de estados, incluyendo, por ejemplo, glucanos libres, glucoconjugados (por ejemplo, glucopéptidos, glucolípidos, proteoglucanos, etc.), o células o componentes celulares, etc.

Los métodos de la presente descripción se pueden usar en una o más etapas del desarrollo del procedimiento para la producción de una glucoproteína terapéutica u otra glucoproteína de interés comercialmente relevante. Los ejemplos no limitantes de tales etapas de desarrollo del procedimiento que pueden emplear métodos de la presente descripción incluyen selección de células, selección clonal, optimización de medios, condiciones de cultivo, condiciones del procedimiento, y/o procedimiento de purificación. Los expertos normales en la técnica estarán al tanto de otras etapas de desarrollo del procedimiento.

La presente descripción también se puede utilizar para monitorizar el grado y/o tipo de glucosilación que aparece en un cultivo celular particular, permitiendo de ese modo el ajuste o posiblemente la terminación del cultivo a fin de lograr, por ejemplo, un patrón de glucosilación deseado particular o para evitar el desarrollo de un patrón de glucosilación indeseado particular.

La presente descripción también se puede utilizar para evaluar las características de glucosilación de células o estirpes celulares que están siendo consideradas para la producción de una glucoproteína deseada particular (por

ejemplo, incluso antes de que las células o estirpes celulares han sido manipuladas para producir la glucoproteína, o para producir la glucoproteína a un nivel comercialmente relevante).

En algunos casos de la descripción, se conoce un patrón de glucosilación deseado para una glucoproteína diana particular, y la tecnología descrita aquí permite monitorizar muestras de cultivo para evaluar el progreso de la producción a lo largo de una ruta que se sabe que produce el patrón de glucosilación deseado. Por ejemplo, cuando la glucoproteína diana es una glucoproteína terapéutica, por ejemplo que ha sufrido una revisión normativa en uno o más países, a menudo será deseable monitorizar cultivos para evaluar la probabilidad de que generarán un producto con un patrón de glucosilación tan parecido al patrón de glucosilación establecido del producto farmacéutico como sea posible, tanto si se produce o no exactamente mediante la misma ruta. Como se usa aquí, “parecido” se refiere a un patrón de glucosilación que tiene al menos alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de correlación con el patrón de glucosilación establecido del producto farmacéutico. En tales casos, las muestras del cultivo de producción se toman típicamente en múltiples puntos de tiempo y se comparan con un estándar establecido o con un cultivo de control a fin de evaluar la glucosilación relativa.

En algunos casos, los métodos según la descripción se pueden usar para monitorizar el patrón de glucosilación de la superficie celular durante el cultivo de células que producen una glucoproteína. Por ejemplo, la producción de una glucoproteína (por ejemplo, producción comercial) puede implicar las etapas de (1) cultivar células que producen la glucoproteína, (2) obtener muestras a intervalos regulares o irregulares durante el procedimiento de cultivo de las células, y (3) analizar el patrón de glucosilación de la superficie celular en las muestras obtenidas. En algunos casos, tales métodos pueden comprender además una etapa de comparar los patrones de glucosilación de la superficie celular de diferentes muestras entre sí y/o con patrones de glucosilación de una o más glucoproteínas no pertenecientes a la superficie celular producidas por la célula o células relevantes. En algunos casos, tales métodos pueden comprender además una etapa de comparar los patrones de glucosilación de la superficie celular para una o más muestras obtenidas con el patrón de glucosilación de una muestra de referencia.

En algunos casos de la presente descripción, un patrón de glucosilación deseado (por ejemplo, un patrón de glucosilación de la superficie celular y/o patrones de glucosilación observados con una glucoproteína producida no perteneciente a la superficie celular) será más extenso. Por ejemplo, en algunos casos, un patrón de glucosilación deseado muestra una ocupación elevada (por ejemplo, mayor que alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de los sitios de glucosilación; en algunos casos, un patrón de glucosilación deseado muestra un grado elevado de ramificación (por ejemplo, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99% o más tienen estructuras tri- o tetra-antenarias).

En algunos casos de la presente descripción, un patrón de glucosilación deseado será menos extenso. Por ejemplo, en algunos casos, un patrón de glucosilación de la superficie celular deseado muestra baja ocupación (por ejemplo, menos de alrededor de 50%, alrededor de 45%, alrededor de 40%, alrededor de 35%, alrededor de 30%, alrededor de 25%, alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 15%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) de los sitios de glucosilación; y/o un bajo grado de ramificación (por ejemplo, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1% o menos tienen estructuras tri- o tetra-antenarias).

Un patrón de glucosilación deseado puede ser más extenso en algunos casos y menos extenso en otros. Por ejemplo, puede ser deseable emplear una estirpe celular que tiende a producir glucoproteínas con cadenas de oligosacáridos largas, no ramificadas. Como alternativa, puede ser deseable emplear una estirpe celular que tiende a producir glucoproteínas con cadenas de oligosacáridos cortas, muy ramificadas.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado estará enriquecido en un tipo particular de estructura de glucano. Por ejemplo, en algunos casos, un patrón de glucosilación deseado tendrá niveles bajos (por ejemplo, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) de estructuras híbridas o con alto contenido de manosa, niveles elevados (por ejemplo, mayores de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de estructuras con alto contenido de manos, niveles elevados (por ejemplo, mayores que alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más; por ejemplo al menos una por glucoproteína) de contenido elevado de manosa fosforilada, o niveles bajos (por ejemplo, menores que alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) de contenido elevado de manosa fosforilada.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá al menos alrededor de un ácido siálico. En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel elevado (por ejemplo, mayor que alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de términos que están sialilados. En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado que incluye sialilación mostrará al menos alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más de ácido *N*-acetilneuramínico y/o menos de

alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos de ácido *N*-glucolilneuramínico.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado muestra especificidad por alargamiento de ramificación (por ejemplo, mayor que alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más de la extensión está en ramificaciones de α1,6 manosa; o mayor que alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más de la extensión está en ramificaciones de α1,3 manosa)

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) o nivel elevado (*por ejemplo*, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de fucosilación central.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel bajo (por ejemplo, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) o nivel elevado (*por ejemplo*, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de un glucano sulfatado.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) o nivel elevado (*por ejemplo*, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de un glucano fosforilado.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1 %, o menos) o nivel elevado (*por ejemplo*, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de un ácido siálico enlazado a una *N*-acetilglucosamina.

En algunos casos, un patrón de glucosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menos de alrededor de 20%, alrededor de 15%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, o menos) o nivel elevado (*por ejemplo*, más de alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o más) de un glucano acetilado.

Tanto si se monitoriza o no la producción de una proteína diana particular con fines de control de calidad, la presente descripción se puede utilizar, por ejemplo, para monitorizar la glucosilación de la superficie celular en etapas particulares de desarrollo, o en condiciones de crecimiento particulares.

En algunos casos particulares de la presente descripción, los métodos descritos aquí se pueden usar para caracterizar y/o controlar o comparar la calidad de productos terapéuticos. Para dar sólo un ejemplo, las presentes metodologías se pueden usar para evaluar la glucosilación de la superficie celular en células que producen un producto proteico terapéutico. Particularmente, dado que la glucosilación puede afectar a menudo a la actividad, biodisponibilidad u otras características del producto proteico terapéutico, los métodos para evaluar la glucosilación celular durante la producción de tal producto proteico terapéutico son particularmente deseables. Entre otras cosas, la presente descripción puede facilitar el análisis en tiempo real de la glucosilación de la superficie celular en sistemas de producción para proteínas terapéuticas.

Tanto si se monitoriza o no la producción de una proteína diana particular con fines de control de calidad, la presente descripción se puede utilizar, por ejemplo, para monitorizar la glucosilación en etapas particulares del desarrollo, o en condiciones de crecimiento particulares.

En algunos casos, los métodos descritos aquí se pueden usar para caracterizar y/o controlar o comparar la calidad de productos terapéuticos. Para dar sólo un ejemplo, las presentes metodologías se pueden usar para evaluar la glucosilación en células que producen un producto proteico terapéutico. Particularmente, dado que la glucosilación puede afectar a menudo a la actividad, biodisponibilidad u otras características de un producto proteico terapéutico, los métodos para evaluar la glucosilación celular durante la producción de tal producto proteico terapéutico son particularmente deseables. Entre otras cosas, la presente descripción puede facilitar el análisis en tiempo real de la glucosilación en sistemas de producción para proteínas terapéuticas.

Los productos glucoproteicos terapéuticos representativos cuya producción y/o calidad se puede monitorizar según la presente descripción incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de agentes hematológicos (incluyendo,

por ejemplo, eritropoyetina, factores de coagulación de la sangre, etc.), interferones, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, enzimas, y hormonas, particularmente aquellos que son expresados en la superficie celular.

En algunos casos, la descripción incluye métodos en los que glucanos de la superficie celular procedentes de diferentes fuentes o muestras se comparan entre sí. En algunos de tales ejemplos, se obtienen a lo largo del tiempo múltiples muestras procedentes de la misma fuente, de manera que se monitoricen los patrones de glucosilación (y particularmente en patrones de glucosilación de la superficie celular). En algunos casos, las muestras que contienen glucanos se retiran a intervalos regulares. En algunos casos, las muestras que contienen glucanos se retiran en intervalos de alrededor de 30 segundos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 2 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 12 horas, o alrededor de 18 horas, o incluso intervalos más largos. En algunos casos, las muestras que contienen glucanos se retiran a intervalos irregulares. En algunos casos, las muestras que contienen glucanos se retiran a intervalos de 5 horas.

En algunos casos, una de las muestras es una muestra histórica o un registro de una muestra histórica. En algunos casos, una de las muestras es una muestra de referencia.

Como se describe aquí, en ciertos casos, los métodos de la presente descripción son útiles para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína producida por una célula. En ciertos casos, tales métodos pueden comprender las etapas de: determinar una diferencia en el patrón de glucosilación entre un primer patrón de glucosilación de superficie presente bajo un primer conjunto de condiciones en la superficie de una célula que produce una glucoproteína de interés y un segundo patrón de glucosilación de superficie presente bajo un segundo conjunto de condiciones en la superficie de la célula, y, basándose en la diferencia determinada, establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés producida por la célula. Por ejemplo, el patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés a lo largo del tiempo se puede determinar determinando los patrones de glucosilación presentes en la superficie de las células a diferentes puntos de tiempo de un cultivo celular.

Adicionalmente, o como alternativa, se pueden ensayar cambios en el patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés que se hace crecer bajo uno o más parámetros de crecimiento diferentes para determinar uno o más parámetros de crecimiento deseables, o combinaciones de parámetros, para la producción de glucoproteínas. En ciertos casos, las diferencias en los patrones de glucosilación se determinan observando y/o midiendo una característica del patrón de glucosilación tal como, sin limitación, la ocupación de los sitios de glucosilación, la identidad de los glucanos enlazados, las cantidades relativas de glucanos enlazados, la composición completa o parcial de glucanos enlazados, y/o las cantidades relativas de glucanos enlazados. Los métodos de la presente descripción engloban observar y/o medir otras características de los patrones de glucosilación conocidas por los expertos normales en la técnica.

En algunos casos particulares, los métodos descritos aquí se pueden usar para caracterizar y/o controlar o comparar la calidad de productos terapéuticos sin necesitar el aislamiento de los propios productos. Para dar sólo un ejemplo, según la presente descripción se pueden usar las metodologías descritas aquí para evaluar la glucosilación en células que producen un producto proteico terapéutico. Particularmente, dado que la glucosilación puede afectar a menudo a la actividad, biodisponibilidad u otras características de un producto proteico terapéutico, los métodos para evaluar la glucosilación celular durante la producción de tal producto proteico terapéutico son particularmente deseables. Entre otras cosas, la presente descripción puede facilitar el análisis en tiempo real de la glucosilación en sistemas de producción para proteínas terapéuticas.

En algunos casos, los métodos proporcionados aquí se usan para monitorizar el grado y/o tipo de glucosilación que se produce en diferentes muestras (por ejemplo, en diferentes cultivos celulares).

En algunos casos, se comparan glucanos procedentes de diferentes muestras de cultivo celular preparadas en condiciones que difieren en uno o más parámetros seleccionados (por ejemplo, tipo celular, tipo de cultivo [por ejemplo, alimentación continua frente a alimentación discontinua, etc.], condiciones de cultivo [por ejemplo, tipo de medios, presencia o concentración de un componente particular del medio o medios particulares, osmolaridad, pH, temperatura, tiempo o grado de desplazamiento en uno o más componentes tal como osmolaridad, pH, temperatura, etc.], tiempo de cultivo, etapas de aislamiento, etc.) pero que son de otro modo idénticos, de manera que se determinan los efectos del parámetro o parámetros seleccionados sobre los patrones de N-glucosilación. En ciertos casos, se comparan glucanos procedentes de diferentes muestras de cultivo celular preparadas en condiciones que difieren en un único parámetro seleccionado, de manera que se determine el efecto del único parámetro seleccionado sobre los patrones de glucosilación. Entre otras aplicaciones, por lo tanto, las presentes técnicas pueden facilitar la determinación de los efectos de parámetros particulares sobre patrones de glucosilación en las células.

En algunos casos, se comparan glucanos de la superficie celular procedentes de diferentes lotes de células que producen una glucoproteína de interés (por ejemplo, una glucoproteína terapéutica), ya sea que se preparen mediante el mismo método o mediante métodos diferentes, y tanto si se preparan simultáneamente o separadamente. En tales casos, la presente descripción facilita el control de calidad de la preparación de

glucoproteína (es decir, de la preparación de una preparación de glucoproteína diana). Como alternativa, o adicionalmente, algunos de tales casos facilitan la monitorización del progreso de un cultivo particular que produce una glucoproteína de interés (por ejemplo, cuando se retiran muestras del cultivo en diferentes puntos de tiempo y se analizan y comparan entre sí). En cualquiera de estos casos, se pueden registrar las características del análisis de glucanos, por ejemplo en un registro de control de calidad. Como se indica anteriormente, en algunos casos, una comparación se realiza con un registro histórico de un lote previo o estándar de glucoproteína, y/o con una muestra de referencia.

En ciertos casos, la presente descripción se puede utilizar en estudios para modificar las características de glucosilación de una célula, por ejemplo para establecer una estirpe celular y/o condiciones de cultivo con una o más características de glucosilación deseables. Tal estirpe celular y/o condiciones de cultivo se pueden utilizar entonces, si se desea, para la producción de un glucoconjugado diana particular (por ejemplo, glucoproteína) para el cual se espera que tal característica o características de glucosilación sean beneficiosas.

Según la presente descripción, las técnicas descritas aquí se pueden usar para detectar glucanos deseables o indeseables, por ejemplo para detectar o cuantificar la presencia de uno o más contaminantes en un producto, o para detectar o cuantificar la presencia de una o más especies activas o deseadas.

En diversos casos, los métodos se pueden usar para evaluar la glucosilación de uno o más biomarcadores indicativos de, por ejemplo, un estado mórbido, antes de la aparición de los síntomas y/o progresión del estado mórbido hacia una condición intratable o menos tratable, detectando uno o más glucanos específicos cuya presencia o nivel (ya sea absoluto o relativo) se puede correlacionar con un estado mórbido particular (incluyendo susceptibilidad a una enfermedad particular) y/o el cambio en la concentración de tales glucanos a lo largo del tiempo. Por ejemplo, en algunos casos de la descripción, el glucoconjugado diana es un biomarcador.

En ciertos casos, los métodos descritos aquí facilitan la detección de glucanos (por ejemplo, glucanos de la superficie celular) que están presentes en niveles muy bajos en una fuente (por ejemplo, una muestra biológica). En tales casos, es posible detectar y/u opcionalmente cuantificar los niveles de glucanos de la superficie celular que están presentes en niveles menores que alrededor de 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025%, o 0,01% en una población de glucanos. En algunos casos, es posible detectar y/u opcionalmente cuantificar los niveles de glucano que comprenden entre 0,1% y 5%, por ejemplo entre 0,1% y 2%, por ejemplo entre 0,1% y 1%, de una preparación de glucano de la superficie celular. En ciertos casos, es posible detectar y/u opcionalmente cuantificar los niveles de glucanos entre alrededor de 0,1 fmoles a alrededor de 1 mmol.

En algunos casos, las técnicas descritas aquí se pueden combinar con una o más tecnologías diferentes para la detección, análisis, y/o aislamiento de glucanos o glucoconjugados.

Kits

Los reactivos útiles para la práctica de uno o más métodos de la presente descripción se pueden proporcionar deseablemente juntos, reunidos en un kit. En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos útiles para liberar glucoproteínas de la superficie celular (por ejemplo, una o más proteasas, glucosidasas, y/u otros agentes) y/o componentes suplementarios tales como tampones, cofactores, etc. En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos útiles para purificar y/o analizar la glucoproteína de la superficie celular liberada procedente de las células a partir de las que se ha liberado.

En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos útiles para escindir estructuras de glucano a partir de una glucoproteína o glucopéptido (por ejemplo, enzimas tales como PNGasa F, PNGasa A, O-glucanasa y/o Endo-H). En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos útiles para purificar las estructuras de glucano escindidas a partir del componente proteico de glucoproteínas o glucopéptidos (por ejemplo, una o más glucosidasas).

En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos para marcar estructuras de glucano. Por ejemplo, los kits de la presente descripción pueden incluir marcadores fluorescentes, radiomarcadores y/o marcadores quimioluminiscentes. En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen 2-aminobenzamida (“2-AB”) fluorescente.

En ciertos casos, los kits de la presente descripción incluyen uno o más reactivos para cultivar células (por ejemplo, medios de cultivo celular, tampones, componentes de los medios, etc.) y/o purificar células después de que las células se han cultivado.

La descripción anterior se entenderá como representativa solamente y no está destinada a ser limitante. Serán manifiestos para un experto en la técnica métodos y materiales alternativos para implementar la presente invención y las aplicaciones adicionales a las que se puede aplicar la presente invención, y están destinados a estar incluidos dentro de las reivindicaciones que se acompañan.

Ejemplificación

Ejemplo 1: La detección de glucanos de la superficie celular liberados mediante tratamiento con exoglucosidasas revela cambios paralelos en la glucosilación de la superficie celular y la glucosilación no de la superficie celular

Se cultivaron células de CHO que produjeron una glucoproteína de la superficie celular de interés (en este caso, un anticuerpo no de la superficie celular) en condiciones estándar en dos medios diferentes: un primer medio que contiene una primera cantidad de glucosamina, y un segundo medio que contiene una segunda cantidad de glucosamina, en el que la segunda cantidad de glucosamina fue mayor que la primera cantidad de glucosamina.

Después de un período dado de crecimiento en cultivo, las células y el sobrenadante del cultivo procedentes del mismo matraz de cultivo se cosecharon. Las células se peletizaron y se lavaron con PBS para eliminar componentes de los medios, y el sobrenadante de cultivo se aclaró antes del aislamiento del anticuerpo producto.

Para el aislamiento del producto, el sobrenadante del cultivo se incubó con perlas de proteína A-sefarosa toda la noche. Las perlas se peletizaron entonces y se lavaron con PBS. El producto se eluyó mediante disolución de glicina 0,1 M a pH bajo.

Una alícuota de las células lavadas se trató con proteasa para liberar glucopéptidos de la superficie celular. Las células intactas se separaron mediante centrifugación de los glucopéptidos de la superficie celular liberados.

Los glucanos se liberaron enzimáticamente con PNGasa F a partir del anticuerpo producto aislado o a partir de los glucopéptidos de la superficie celular liberados. Los glucanos aislados se marcaron fluorescentemente y se trataron con exoglucosidasa (sialidasa, galactosidasa, y hexosaminidasa) para colapsar los glucanos enlazados mediante N hasta el núcleo M3N2; los glucanos que se liberaron mediante este tratamiento se analizaron mediante LC y/o MS, de manera que se determinaron las cantidades relativas de glucanos fucosilados y no fucosilados.

La Figura 1 muestra el porcentaje de glucanos no fucosilados observado para la glucoproteína no perteneciente a la superficie celular (producto anticuerpo) en el primer medio (control) y en el segundo medio (glucosamina elevada); las Figuras 3A-B muestran el mismo porcentaje observado para glucanos de la superficie celular en los mismos medios. La Figura 2 muestra los espectros representativos de LC para glucanos de la superficie celular, como se incluyó en los datos resumidos de las Figuras 3A-B.

Como es evidente en las Figuras 1 y 3, se observa un incremento similar de estructuras no fucosiladas (es decir, pérdida de la fucosilación alfa1-6 central) tanto para las poblaciones de glucanos no pertenecientes a la superficie celular como de glucanos de la superficie celular. Estos datos demuestran tanto que los métodos utilizados según la presente descripción permiten la detección fácil, aislamiento y/o análisis de glucanos de la superficie celular, así como demuestran además que los cambios en los patrones de glucosilación no de la superficie celular se pueden reflejar en cambios análogos en patrones de glucosilación de la superficie celular, de manera que la detección de los glucanos de la superficie celular puede actuar como un poder para la detección de glucanos no pertenecientes a la superficie celular.

Ejemplo 2: La detección de glucanos de la superficie celular en células intactas o de glucanos de la superficie celular liberados revela cambios paralelos en la glucosilación de la superficie celular y no de la superficie celular

Células de CHO que produjeron una glucoproteína de la superficie celular de interés (en este caso, un anticuerpo no de la superficie celular) se cultivaron en condiciones estándar en dos medios diferentes: un primer medio que contiene una primera cantidad de N-acetilmanosamina, y un segundo medio que contiene una segunda cantidad de N-acetilmanosamina, en el que la segunda cantidad de N-acetilmanosamina fue mayor que la primera cantidad de N-acetilmanosamina.

Después de un período dado de crecimiento en cultivo, las células y el sobrenadante del cultivo celular procedentes del mismo matraz de cultivo se cosecharon. Las células se peletizaron y se lavaron con PBS para eliminar los componentes de los medios. El sobrenadante del cultivo se aclaró.

El producto de anticuerpo no de la superficie celular se aisló del sobrenadante del cultivo mediante incubación toda la noche con perlas de proteína A-sefarosa. Las perlas se peletizaron entonces y se lavaron con PBS. El producto se eluyó mediante disolución de glicina 0,1 M a pH bajo.

Una alícuota de las células lavadas se sometió a lisis mediante exposición a disolución hipotónica, y las membranas resultantes se peletizaron.

Los ácidos siálicos se liberaron del producto de anticuerpo aislado, y las membranas mediante tratamiento con ácido, y se aislaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Los ácidos siálicos resultantes se marcaron subsiguientemente con DMB (1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno-2HCl), y se analizaron mediante HPLC.

Concurrentemente, una segunda alícuota de células lavadas se sometió a tinción con lectina y se analizó mediante citometría de flujo. Los niveles de ácido siálico se determinaron tanto para las muestras de glucano de la superficie celular como para las muestras de glucano no de la superficie celular, bajo cada condición de cultivo.

La Figura 4 muestra un análisis representativo de LC de los niveles de ácido siálico procedentes de la superficie celular. Las Figuras 5-7 muestran cantidades relativas de ácido siálico en glucanos de la superficie celular y glucanos no de la superficie celular bajo las diferentes condiciones de cultivo. Como se puede observar, se observa un incremento similar en los niveles de ácido siálico tanto en las poblaciones de glucanos no de la superficie celular como de las poblaciones de glucanos de la superficie celular cuando las células se hacen crecer en niveles elevados de N-acetilmanosamina.

Estos datos demuestran que tanto los métodos descritos aquí permiten la detección fácil, aislamiento y/o análisis de glucanos de la superficie celular, como demuestran además que los cambios en los patrones de glucosilación no de la superficie celular se pueden reflejar en cambios análogos en patrones de glucosilación de la superficie celular, de manera que la detección de los glucanos de la superficie celular puede actuar como un poder para la detección de glucanos no de la superficie celular. De forma importante, los datos demuestran la capacidad para monitorizar la glucosilación de un producto de interés en tiempo real, sin necesitar el aislamiento del propio producto.

Ejemplo 3: Efecto de la suplementación de glucosamina sobre la superficie celular y sialilación del producto

Células de CHO que producen un producto de glucoproteína se cultivaron en presencia o ausencia de suplementación de glucosamina. Después de 5 días, las células y el producto se cosecharon y se analizaron para determinar separadamente el contenido de ácido siálico. El contenido de ácido siálico de la superficie celular se determinó mediante cromatografía de intercambio aniónico como se ilustra en la Figura 8. El porcentaje de cambio de ácido siálico con respecto a la suplementación sin glucosamina se muestra en la Tabla 2 más abajo, tanto para la superficie celular como para el producto. Los datos en la Tabla 2 se indican como la media (S.D.) de réplicas.

Tabla 2. Porcentaje de disminución en la sialilación

Condición de fermentación	% de disminución en la sialilación	
	Producto	Superficie celular
Glucosamina	16% (2,8)	20% (4,6)

Estos datos demuestran que las disminuciones en la sialilación de la superficie celular asociadas con la suplementación de glucosamina se correlacionan con disminuciones en la sialilación del producto.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando experimentación rutinaria, muchos equivalentes a los casos específicos de la descripción, por ejemplo realizaciones de la presente invención, descritos aquí. El alcance de la presente invención no pretende estar limitado a la Descripción anterior, sino más bien es como se expone en las reivindicaciones anejas.

En las reivindicaciones, los artículos tales como “un”, “una”, y “el/la” pueden significar uno o más de uno, excepto que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen “o” entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son de otro modo relevantes para un producto o procedimiento dado, excepto que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. La descripción incluye casos en los que está presente exactamente un miembro del grupo en, se emplea en, o de otro modo es relevante para un producto o procedimiento dado. La descripción incluye casos en los que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otro modo son relevantes a un producto o procedimiento dado.

Además, se entenderá que la descripción engloba todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enunciadas se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que sea dependiente de otra reivindicación se puede modificar para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que sea dependiente de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones citan una composición, se entenderá que están incluidos los métodos de uso de la composición para cualquiera de los fines descritos aquí, y están incluidos los métodos para obtener la composición según cualquiera de los métodos de obtención descritos aquí u otros métodos conocidos en la técnica, excepto que se indique de otro modo o excepto que fuese evidente para un experto normal en la técnica que surge una contradicción o inconsistencia.

Cuando se presentan elementos como listas, *por ejemplo*, en formato de grupo de Markush, se entenderá que cada subgrupo de los elementos también está descrito, y se puede eliminar del grupo cualquier elemento o elementos. Se debería entender que, en general, cuando la descripción, o casos de la descripción, se refieran a comprender elementos particulares, rasgos, *etc.*, ciertos casos de la descripción consisten, o consisten esencialmente, en tales elementos, rasgos, *etc*. Para los fines de simplicidad, esos casos no se han expuesto específicamente aquí *en estas palabras*. Se ha de señalar que la expresión “que comprende” pretende ser abierta, y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

Cuando se dan intervalos, se incluyen puntos finales. Además, se entenderá que, excepto que se indique de otro modo o sea evidente de otro modo a partir del contexto y comprensión de un experto normal en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos señalados en diferentes casos de la descripción, hasta la décima unidad del límite inferior del intervalo, excepto que el contexto dicte claramente otra cosa.

Además, se entenderá que cualquier realización particular de la presente invención que cae dentro de la técnica anterior se puede excluir explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Puesto que tales realizaciones se consideran conocidas por un experto normal en la técnica, se pueden excluir incluso si la exclusión no se expone explícitamente aquí. Cualquier realización particular de la presente invención (*por ejemplo*, cualquier exoglucosidasa, cualquier enlace glucosídico, cualquier condición de reacción, cualquier método de purificación, cualquier método de análisis del producto, *etc.*) se puede excluir de una cualquiera o más de las reivindicaciones, por cualquier razón, tanto si está o no relacionada con la existencia de técnica anterior.

Las publicaciones expuestas aquí y a lo largo del texto se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí se ha de considerar como una admisión de que los inventores no están facultados para antedatar tal descripción en virtud de la descripción previa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por una célula, comprendiendo el método las etapas de:

a) determinar una diferencia en el patrón de glucosilación entre:

(i) un primer patrón de glucosilación de superficie presente bajo un primer conjunto de condiciones en la superficie de una célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular; y

(ii) un segundo patrón de glucosilación de superficie presente bajo un segundo conjunto de condiciones en la superficie de la célula; y

b) basándose en la diferencia determinada, establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por la célula.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características comprende un cambio en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa para determinar una diferencia comprende determinar una diferencia en la sialilación entre los patrones de glucosilación de superficie primero y segundo.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la etapa de establecer una o más características comprende establecer una extensión de la sialilación presente en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

5. El método de la reivindicación 1, en el que:

la célula productora de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular es un cultivo de células que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

el primer conjunto de condiciones representa un primer punto de tiempo de manera que el primer patrón de glucosilación de superficie es un patrón presente en la superficie de las células en cultivo en el primer punto de tiempo; y

el segundo conjunto de condiciones representa un segundo punto de tiempo de manera que el segundo patrón de glucosilación de superficie es un patrón presente en la superficie de las células en cultivo en el segundo punto de tiempo,

de manera que la etapa de establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular implica establecer un cambio a lo largo del tiempo en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, y de ese modo permite la evaluación del estado o calidad de la producción.

6. El método de la reivindicación 1, en el que:

la célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular es un cultivo de células que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

los conjuntos primero y segundo de condiciones representan diferentes colecciones de parámetros de crecimiento aplicados al cultivo de células que producen la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular,

de manera que se establezcan los parámetros de crecimiento deseables para la producción de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

7. Un método que comprende las etapas de

a) determinar una diferencia en el patrón de glucosilación entre:

(i) un primer patrón de glucosilación de superficie presente en la superficie de células en un primer cultivo de células; y

(ii) un segundo patrón de glucosilación de superficie presente en la superficie de células en cultivo, en el que el primer cultivo y el segundo cultivo difieren entre sí con respecto a al menos un parámetro; y

b) basándose en la diferencia determinada, establecer efectos del al menos un parámetro sobre la glucosilación de glucoproteínas de interés producidas por células en cultivo;

caracterizado porque las glucoproteínas de interés son glucoproteínas no pertenecientes a la superficie celular.

8. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 7, en el que la etapa de determinar una diferencia comprende determinar una diferencia en una característica seleccionada del grupo que consiste en: grado de ocupación de sitios de glucosilación, identidad de glucanos enlazados, cantidades relativas de glucanos enlazados, composición completa o parcial de glucanos enlazados, cantidades relativas de glucanos enlazados, y sus combinaciones.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende liberar al menos un glucano de la superficie celular a partir de la célula, y analizar el glucano liberado.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la etapa de liberación comprende exponer la célula a una proteasa.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la etapa de exposición comprende someter a tratamiento con proteasa de manera que se libere al menos una glucoproteína de la superficie celular, en el que el tratamiento con proteasa no rompe sustancialmente las membranas celulares.

12. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 7, en el que la etapa de determinación no implica liberar glucanos a partir de células.

13. El método de la reivindicación 9, en el que la etapa de liberación comprende:

a) escindir uno o más glucanos de la superficie celular enlazados a proteínas a partir de glucoproteínas de la superficie celular; y

b) caracterizar el uno o más glucanos de la superficie celular escindidos enlazados a proteína.

14. El método de la reivindicación 13, en el que el glucano de la superficie celular enlazado a proteína es un glucano enlazado mediante N.

15. El método de la reivindicación 13, en el que el glucano de la superficie celular enlazado a proteína es un glucano enlazado mediante O.

16. El método de la reivindicación 13, en el que el glucano de la superficie celular enlazado a proteína comprende un glucano complejo, y comprende al menos un resto de ácido siálico.

17. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 7, que comprende además una etapa de registrar información sobre la diferencia determinada o sobre al menos uno de los patrones de glucosilación en un medio fijo.

18. Un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular producida por una célula, comprendiendo el método:

a) proporcionar una célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, célula la cual tiene al menos un glucano de la superficie celular unido a la superficie de la célula, de manera que la célula tiene un patrón de glucosilación de la superficie celular; y

b) determinar al menos una característica del patrón de glucosilación de la superficie celular; y

c) basándose en la característica determinada, establecer una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que la característica determinada se correlaciona con la una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

19. Un método para determinar una o más diferencias en el patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, que comprende:

a) proporcionar una primera célula que comprende al menos un primer glucano de la superficie celular unido a la superficie de la primera célula, primera célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

b) caracterizar el al menos un primer glucano de la superficie celular;

c) proporcionar una segunda célula que comprende al menos un segundo glucano de la superficie celular unido a la superficie de la segunda célula, segunda célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular;

d) caracterizar el al menos un segundo glucano de la superficie celular;

e) determinar una o más diferencias entre el primer glucano de la superficie celular y el segundo glucano de la superficie celular; y

f) establecer una o más diferencias en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que la diferencia o diferencias determinadas entre el primer glucano de la superficie celular y el segundo glucano de la superficie celular se correlacionan con la una o más diferencias en el patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

20. Un método para determinar una o más características del patrón de glucosilación de una glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula que comprende al menos un glucano de la superficie celular unido a la superficie de la célula, célula la cual produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular; y

b) caracterizar el al menos un glucano de la superficie celular; y

c) determinar una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular, en el que el al menos un glucano caracterizado se correlaciona con la una o más características del patrón de glucosilación de la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular es aquella que no es producida de forma natural por la célula.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular se ha manipulado para producir la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular es aquella que es producida de forma natural por la célula, y en el que la célula que produce la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular se ha manipulado para producir la glucoproteína de interés no perteneciente a la superficie celular en un nivel elevado o en condiciones predeterminadas.

Figura 1: Pérdida de fucosilación central en glucoproteína de anticuerpo expresada producida en medio de cultivo celular que contiene una concentración elevada de glucosamina

Pérdida de fucosilación central en el producto

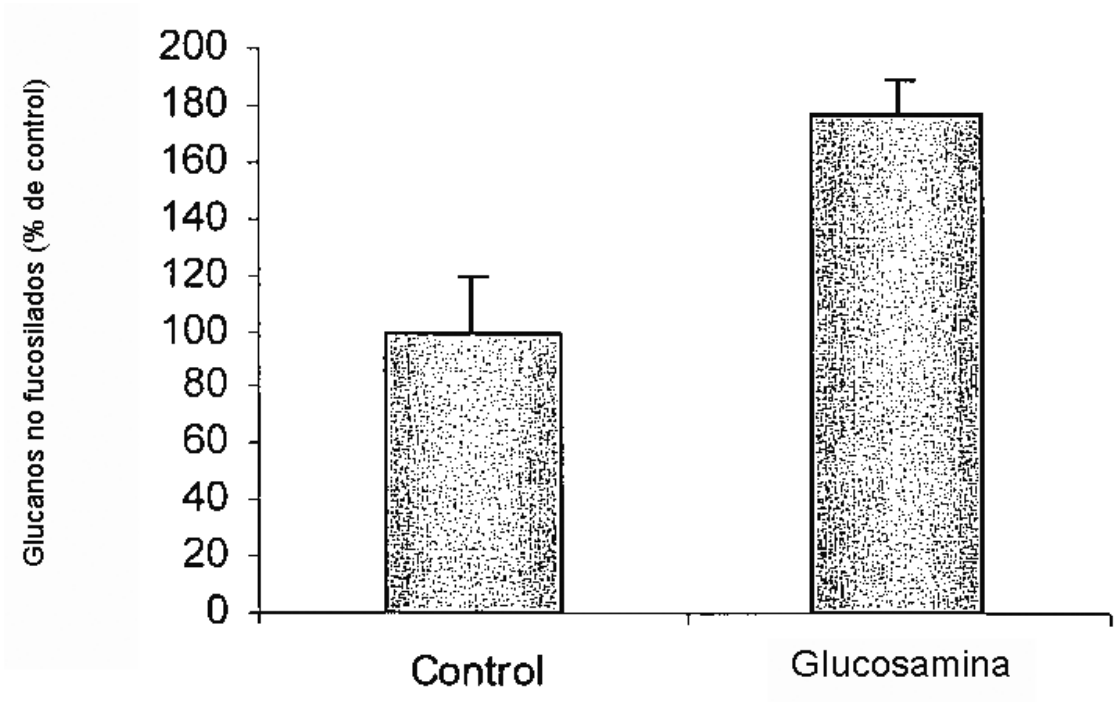


Figura 2: Pérdida de fucosilación central en glucoproteínas de la superficie celular producidas en medio de cultivo celular que contiene una concentración elevada de glucosamina

Pérdida de fucosilación central en glucanos de la superficie celular

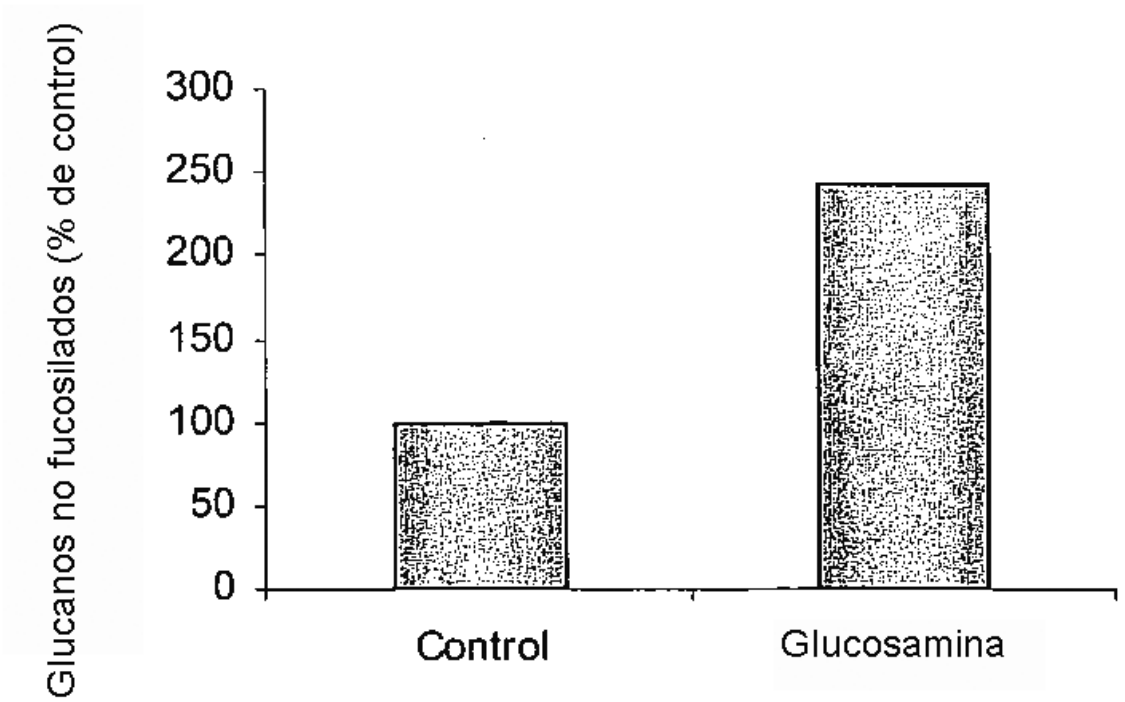


Figura 3A: Estructuras de glucanos de glucoproteínas de la superficie celular que se hacen crecer en medio de control

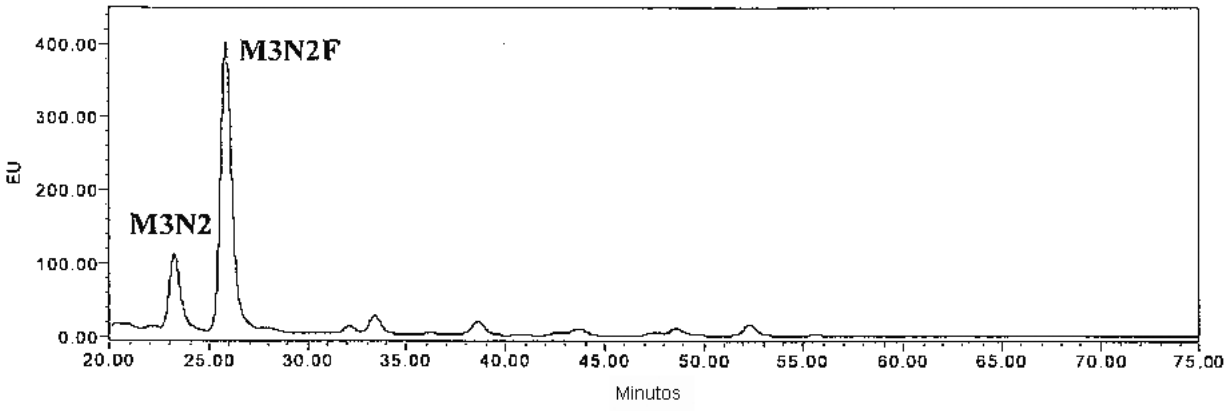


Figura 3B: Estructuras de glucanos de glucoproteínas de la superficie celular que se hacen crecer en medio que contiene una concentración elevada de glucosamina

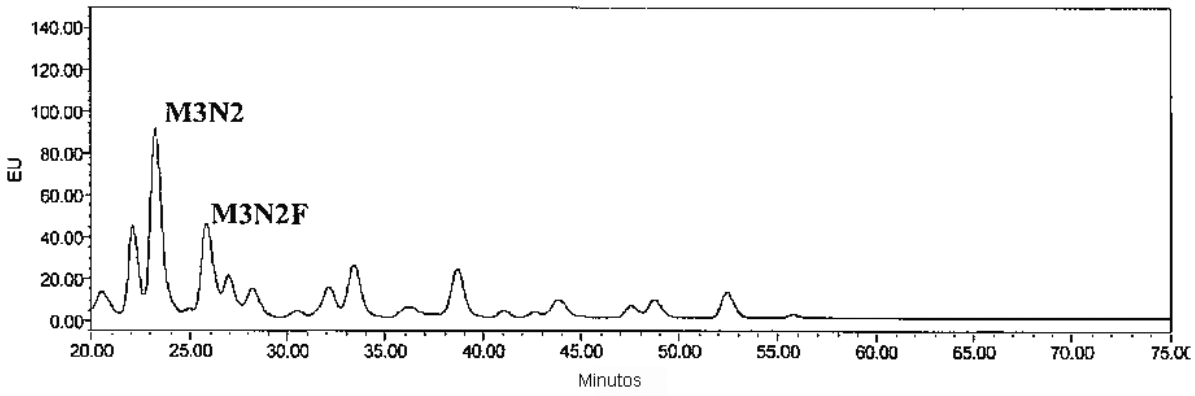


Figura 4: Análisis mediante cromatografía de líquidos de los niveles de ácido siálico de glucoproteínas expresadas de anticuerpo recombinante y de la superficie celular

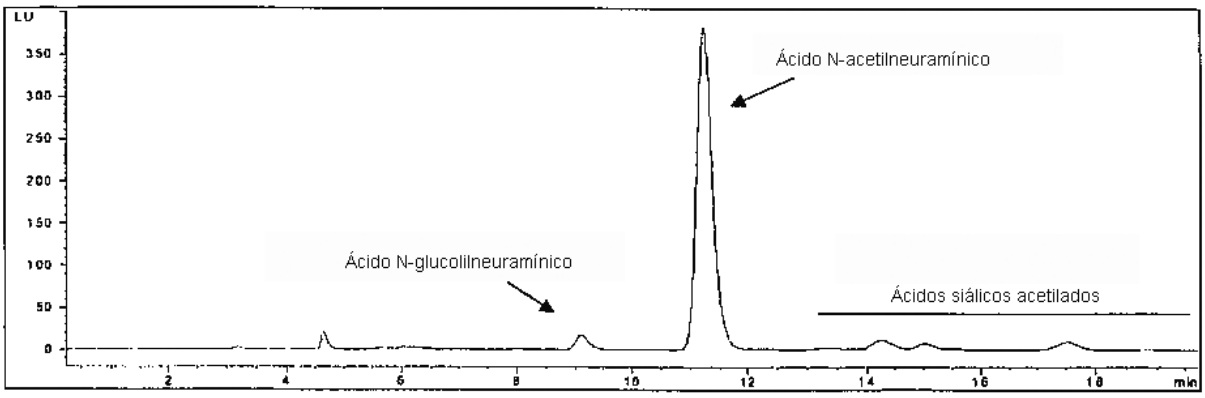


Figura 5: Niveles de ácido siálico en glucoproteína de anticuerpo expresada producida en medio de cultivo celular que contiene una concentración elevada de N-acetilmanosamina

Nivel de ácido siálico en el producto

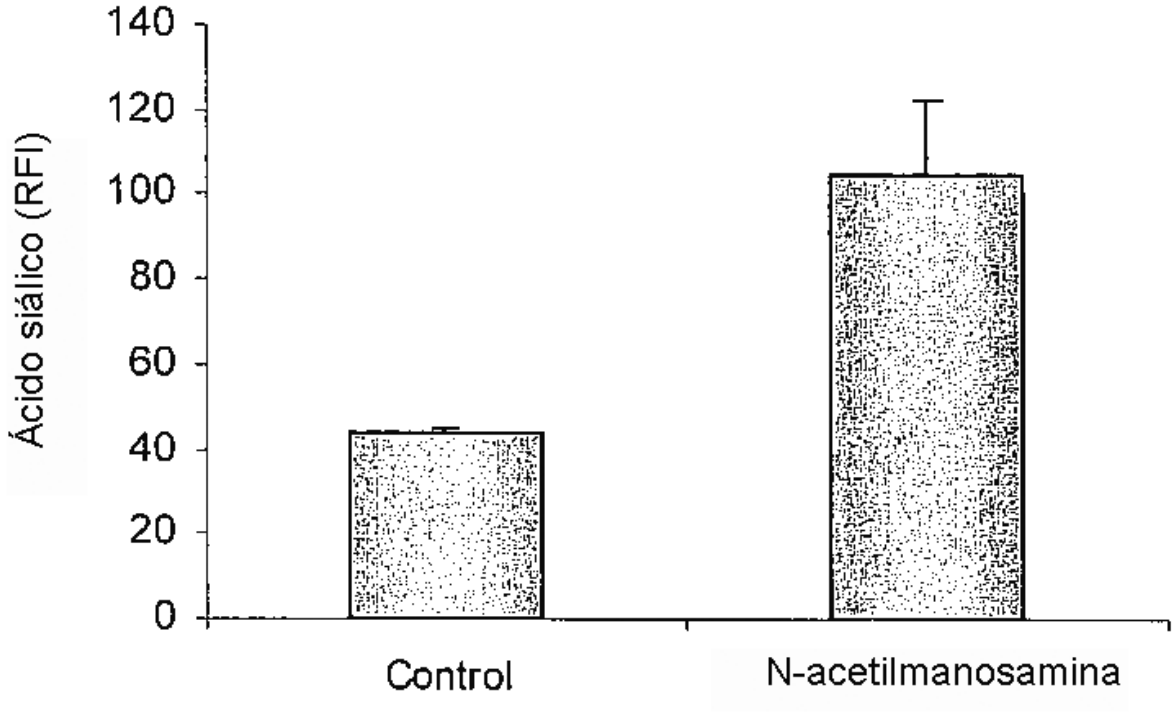


Figura 6: Niveles de ácido siálico en glucoproteínas de la superficie celular producidas en medio de cultivo celular que contiene una concentración elevada de N-acetilmanosamina

Niveles de ácido siálico en la superficie celular

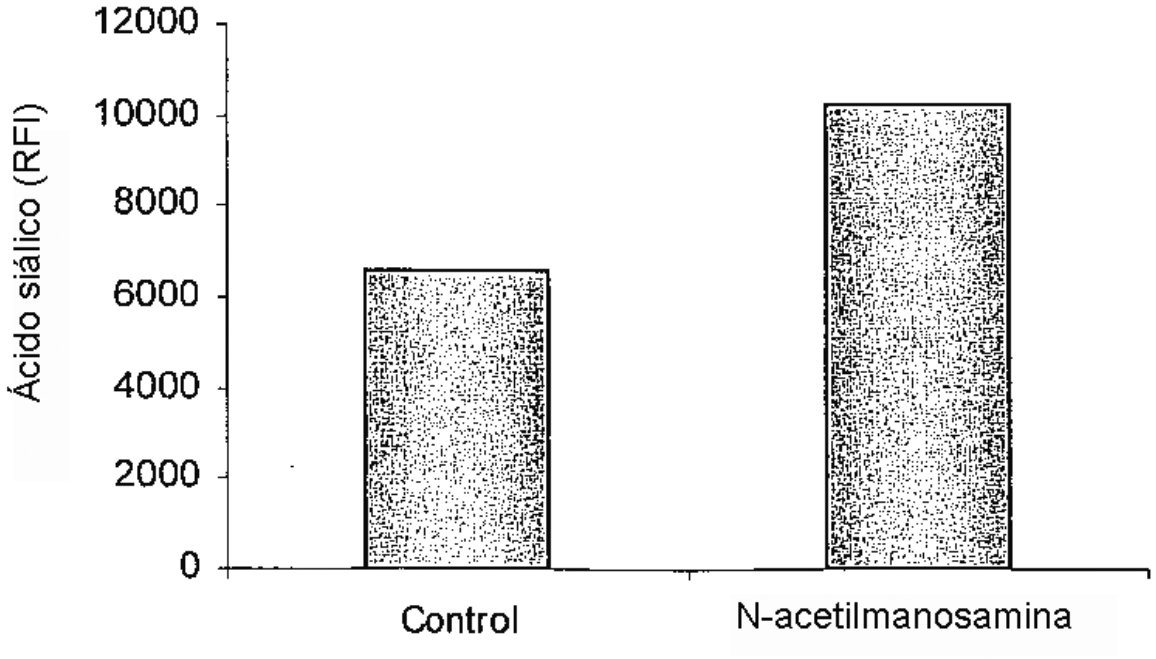


Figura 7: Niveles de ácido siálico en glucoproteínas de la superficie celular producidas en medio de cultivo celular que contiene una concentración elevada de N-acetilmanosamina

Nivel de ácido siálico en la superficie celular

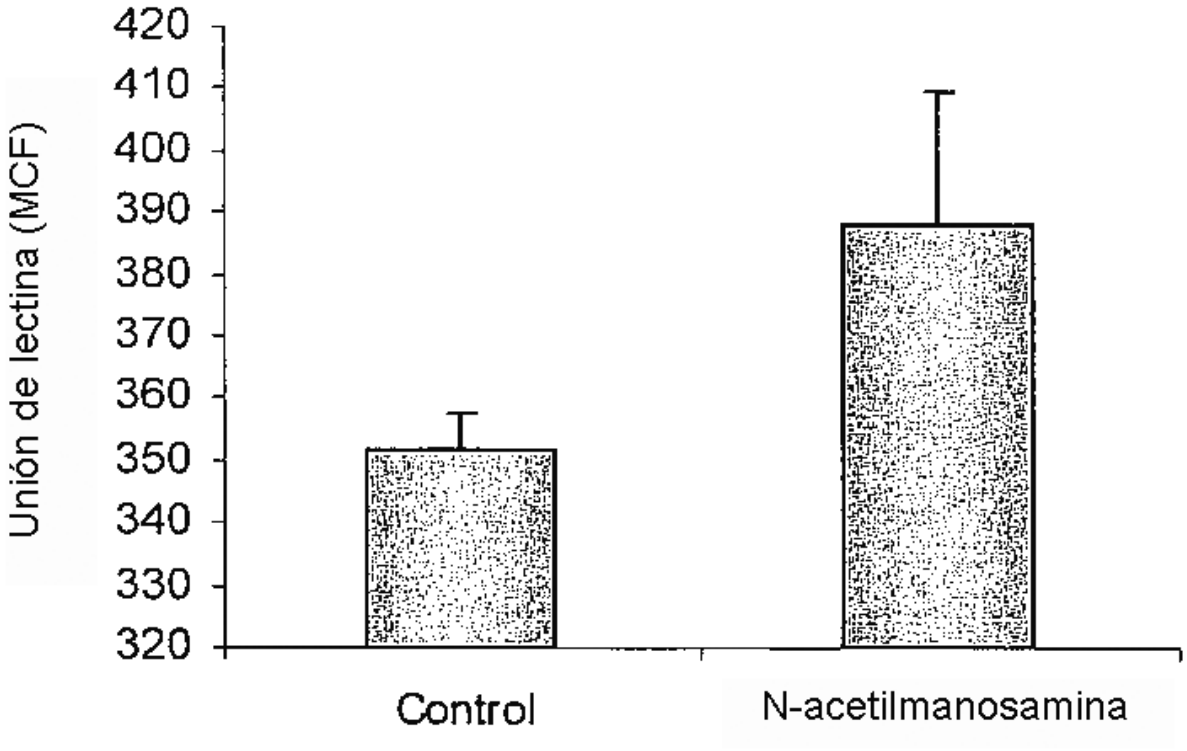
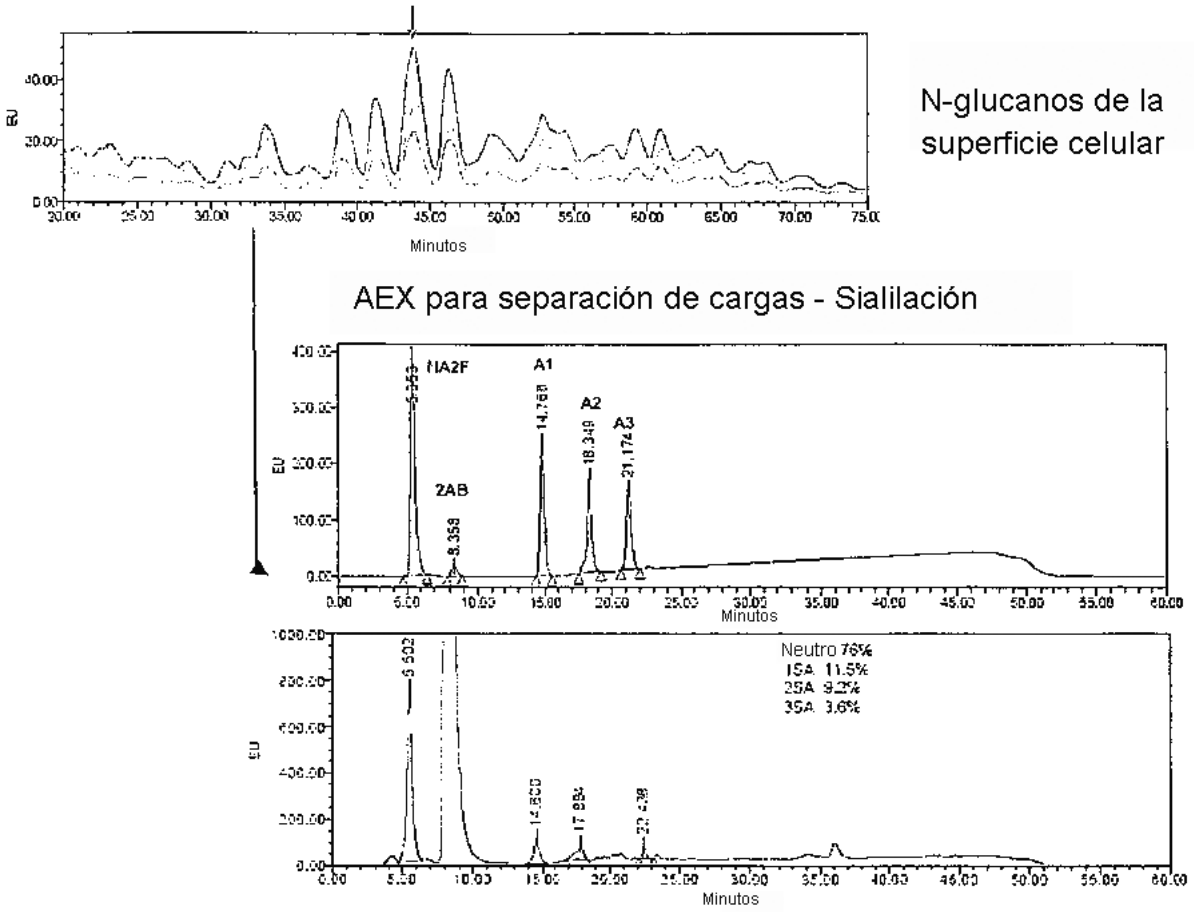



Figura 8: Contenido de ácido siálico de la superficie celular determinado mediante cromatografía de intercambio aniónico de glucanos de la superficie celular