

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 487**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 07796784 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2041270**

54 Título: **Producción de glucoproteínas**

30 Prioridad:

13.07.2006 US 830658 P

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

29.01.2014

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

**LASKO, DANIEL R. y
KOZA, STEPHAN M.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 440 487 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de glucoproteínas

Esta invención se refiere a un procedimiento para producir una glucoproteína en un medio de cultivo celular que comprende manganeso, y a un medio de cultivo celular para su uso en dicho procedimiento.

5 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas y los polipéptidos se han convertido en unos agentes terapéuticos cada vez más importantes. En la mayoría de los casos, estas proteínas y polipéptidos se producen en un cultivo celular a partir de células que han sido modificadas por ingeniería genética y/o seleccionadas para producir unos niveles inusualmente altos de la proteína o del polipéptido de interés en particular. El control y la optimización de las condiciones de cultivo celular son críticamente importantes para el éxito de la producción comercial de proteínas y polipéptidos.

Muchas proteínas y polipéptidos producidos en cultivo celular son glucoproteínas que contienen estructuras de carbohidratos unidos covalentemente, incluidas cadenas de oligosacáridos. Estas cadenas de oligosacáridos son unidas a la proteína en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi a través de enlaces de N o de enlaces de O. Las cadenas de oligosacáridos pueden comprender una porción significativa de la masa de la glucoproteína. Se cree que las cadenas de oligosacáridos juegan unos papeles clave en la función de la glucoproteína, incluyendo facilitar un correcto plegamiento de la glucoproteína, mediar en las interacciones proteína-proteína, conferir estabilidad, conferir unas propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas ventajosas, inhibir la digestión proteolítica, dirigir la glucoproteína a la vía de secreción adecuada y dirigir la glucoproteína a un órgano u órganos en particular.

Generalmente, las cadenas de oligosacáridos unidas por N se añaden a la proteína emergente en translocación en la luz del retículo endoplásmico (véase *Molecular Biology of the Cell*, de Alberts y col., 1994). El oligosacárido es añadido al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparragina contenido en la secuencia consenso objetivo de Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La cadena inicial de oligosacáridos habitualmente es recortada por unas enzimas específicas de glucosidasa en el retículo endoplásmico, dando como resultado un núcleo de oligosacárido corto y ramificado formado por dos residuos de N-acetilglucosamina y tres de manosa.

Después del procesado inicial en el retículo endoplásmico, la glucoproteína es trasladada a través de vesículas pequeñas al aparato de Golgi, donde la cadena de oligosacárido experimenta un procesado adicional antes de ser secretada a la superficie celular. La cadena de oligosacárido recortada unida por N puede ser modificada mediante la adición de varios residuos de manosa, dando como resultado un oligosacárido con un alto contenido en manosa. Alternativamente, pueden añadirse una o más unidades de N-acetilglucosamina de los monosacáridos a las subunidades de manosa de núcleo para formar oligosacáridos complejos. Puede añadirse galactosa a las subunidades de N-acetilglucosamina, y pueden añadirse subunidades de ácido siálico a las subunidades de galactosa, dando como resultado cadenas que terminan en cualquiera de un residuo de ácido siálico, de galactosa o de N-acetilglucosamina. Adicionalmente, puede añadirse un residuo de fucosa a un residuo de N-acetilglucosamina del oligosacárido de núcleo. Cada una de estas adiciones está catalizada por glucosiltransferasas específicas.

Además de ser modificadas mediante la vía de glucosilación unida por N, las glucoproteínas también pueden ser modificadas mediante la adición de cadenas de oligosacáridos unidas por O a residuos específicos de serina o de treonina según son procesadas en el aparato de Golgi. Los residuos de un oligosacárido unido por O se añaden uno por uno, y la adición de cada residuo está catalizada por una enzima específica. Al contrario que la glucosilación unida por N, la secuencia consenso de aminoácidos para la unión por O no está tan bien definida.

La calidad y el grado finales de glucosilación de la proteína pueden verse drásticamente afectados por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos de cultivo tradicionales por lotes y semicontinuos se han centrado en el nivel final de péptido producido, y a menudo dan como resultado una producción de una glucoproteína con un patrón de glucosilación menos extenso y/o un patrón de glucosilación cuyos residuos de azúcar de las cadenas de oligosacáridos reflejan muy poco los residuos de azúcar que están presentes en la forma natural de la glucoproteína. El aumento de la extensión de la glucosilación y/o el ajuste de la composición de los residuos de azúcar para que reflejen más fielmente el nivel y la composición de la glucosilación que están presentes en la forma natural de la glucoproteína, podrían dar potencialmente como resultado un agente de una glucoproteína terapéutica con una mayor potencia, unas propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas mejoradas y menos efectos secundarios. Aunque se han realizado algunos esfuerzos para mejorar la calidad y la cantidad de la glucosilación de las glucoproteínas producidas en cultivo celular, permanece una necesidad de mejoras adicionales. Existe una necesidad en particular de desarrollar sistemas para la producción de glucoproteínas con unos patrones de glucosilación mejorados mediante el cultivo celular en medio *defmed*.

55 **Sumario de la invención**

Los procedimientos y las composiciones de la presente invención proporcionan un sistema mejorado para la producción a gran escala de glucoproteínas con unos patrones de glucosilación mejorados en cultivo celular. Por

ejemplo, en ciertas formas de realización, la presente invención proporciona procedimientos de cultivo a escala comercial (por ejemplo, de 500 l o más) que utilizan un medio que contiene una concentración molar acumulativa de manganeso de entre aproximadamente 10 y 600 nM. En ciertas formas de realización, la concentración molar acumulativa de glutamina en el medio es menor de aproximadamente 8 mM. En ciertas formas de realización, la concentración molar acumulativa de glutamina en el medio es menor de aproximadamente 4 mM. Debería entenderse que "acumulativo", según se usó anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente o componentes en particular añadidos durante el transcurso del cultivo celular, incluyendo los componentes añadidos al comienzo del cultivo y los componentes añadidos subsiguientemente. En ciertas formas de realización de la invención, es deseable minimizar las "aportaciones" en el cultivo con el tiempo, por lo que es deseable maximizar las cantidades presentes inicialmente. Por supuesto, los componentes del medio son metabolizados durante el cultivo, por lo que cultivos con las mismas cantidades acumulativas de unos componentes dados tendrán diferentes niveles absolutos si sus componentes son añadidos en momentos diferentes (por ejemplo, todos los presentes inicialmente frente a algunos añadidos mediante aportaciones).

Según la presente invención, el uso de dicho medio permite la producción de glucoproteínas que contienen unos patrones de glucosilación deseables. En algunas formas de realización, las glucoproteínas pueden tener un patrón de glucosilación más amplio y/o pueden tener una distribución de las cadenas de oligosacáridos que se parezca más a la distribución de las cadenas de oligosacáridos aplicada a la glucoproteína por la célula hospedadora natural. En algunas formas de realización, el uso del sistema inventivo puede dar como resultado la producción de una glucoproteína con un patrón de glucosilación similar o idéntico al patrón de glucosilación que estaría presente si la glucoproteína fuera expresada en una célula humana endógena.

El experto habitual en la técnica comprenderá que las formulaciones de los medios de la presente invención engloban tanto medios definidos como complejos. En ciertas formas de realización, el medio de cultivo es un medio definido en el que la composición del medio es conocida y está controlada.

Los cultivos celulares de la presente invención pueden estar opcionalmente complementados con nutrientes y/u otros componentes de medios que incluyen hormonas y/u otros factores de crecimiento, en particular iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a unas concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso complementar el medio con inductores químicos tales como hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y butirato sódico ("NaB"). Dichos complementos adicionales pueden añadirse al comienzo del cultivo o pueden añadirse en un punto posterior con objeto de reponer los nutrientes agotados o por otra razón. En general, es deseable seleccionar la composición del medio inicial para minimizar la complementación de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la investigación de la actividad glucosídica en el material retenido en la UF/DF. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 2 muestra las distribuciones de las especies de K4 en el rFIX generado en cultivos en matraces con agitación. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 3 muestra las distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con diversos aditivos en el medio. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 4 muestra la distribución de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con medio complementado. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 5 muestra las distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con diversos aditivos en el medio. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 6 muestra las distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con unos niveles de manganeso variables. Para cada experimento, las barras que representan las diversas especies de K4 y K4' son, de izquierda a derecha: K4 (Fuc-GlcNAc-Gal-SA), K4' (Fuc-GlcNAc-Gal), K4' (Fuc-GlcNAc) y K4' (Fuc).

La Figura 7 muestra una comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos de G0, G1 y G2 HPAEC-PED. Para cada experimento, las barras que representan el complejo biantenarico de glucanos unidos por N son, de izquierda a derecha: G0, G1 y G2.

La Figura 8 muestra una comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos de G0, G1 y G2 HPAEC-PED. Para cada experimento, las barras que representan el complejo biantenarico de glucanos unidos por N

son, de izquierda a derecha: G0, G1 y G2.

Definiciones

5 "Aminoácido": el término "aminoácido", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de los 30 aminoácidos naturales que se usan normalmente en la formación de polipéptidos, o a análogos o derivados de esos aminoácidos, o a cualquier aminoácido no natural. Los aminoácidos de la presente invención se proporcionan en un medio para cultivos celulares. Los aminoácidos aportados al medio pueden proporcionarse como sales o en forma de un hidrato.

10 "Anticuerpo": el término "anticuerpo", según se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o a una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, tal como un fragmento Fab o F(ab')₂. En ciertas formas de realización, un anticuerpo es un anticuerpo natural típico conocido por los expertos habituales en la técnica, por ejemplo, una glucoproteína que comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En ciertas formas de realización, un anticuerpo es un anticuerpo de cadena única. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un anticuerpo de cadena única comprende
15 una variante de un anticuerpo natural típico en el que dos o más miembros de las cadenas pesada y/o ligera se han unido covalentemente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de cadena única es una proteína con una estructura de la cadena de dos polipéptidos constituida por una cadena pesada y una ligera, cadenas que están estabilizadas, por ejemplo, por conectores peptídicos intercatenarios, proteína que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. En ciertas formas de realización, un anticuerpo es un anticuerpo formado únicamente por cadenas pesadas, tales como, por ejemplo, aquellos encontrados de forma natural en miembros de la familia Camelidae, incluyendo llamas y camellos (véanse, por ejemplo, los números de Patente de EE.UU. 6.765.087 de Casterman y col., 6.015.695 de Casterman y col., 6.005.079 y de Casterman y col.). Los términos "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una población de moléculas de anticuerpos que únicamente contienen una especie de un sitio de unión al antígeno, y por lo tanto interactúan habitualmente sólo con un único epítipo o antígeno en particular. Las composiciones de anticuerpos monoclonales muestran por lo tanto típicamente una única afinidad de unión por un epítipo en particular, con el que inmunorreaccionan. Los términos anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpo policlonal" se refieren a poblaciones de moléculas de anticuerpos que contienen múltiples especies de sitios de unión al antígeno que interactúan con un antígeno en particular.
20
25
30

"Cultivo por lotes": el término "cultivo por lotes", según se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que todos los componentes que se usarán finalmente para cultivar las células, incluyendo el medio (véase definición de "medio", a continuación), así como las propias células, son proporcionados al inicio de los procesos de cultivo. Un cultivo por lotes se detiene típicamente en el mismo punto y las células y/o los componentes del medio se recogen y opcionalmente se purifican.
35

"Biorreactor": el término "biorreactor", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier recipiente usado para el crecimiento de un cultivo de células de mamífero. Un biorreactor puede tener cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células de mamífero. Típicamente, dicho biorreactor será de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los mismos. Las condiciones internas del biorreactor, que incluyen, pero no se limitan a, el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura, se controlan típicamente durante el periodo de cultivo. Un biorreactor puede estar formado por cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamífero suspendidos en un medio en las condiciones de cultivo de la presente invención, incluyendo vidrio, plástico o metal. El término "biorreactor de producción", según se usa en el presente documento, se refiere al biorreactor final usado en la producción de la glucoproteína de interés. El volumen de biorreactor de producción es típicamente de al menos 500 litros y puede ser de 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los mismos. El experto habitual en la técnica será consciente y capaz de elegir los biorreactores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención.
40
45

"Densidad celular": el término "densidad celular", según se usa en el presente documento, se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio.
50

"Viabilidad celular": el término "viabilidad celular", según se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células del cultivo para sobrevivir en un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término según se usa en el presente documento también se refiere a aquella porción de células que está viva en un momento en particular con respecto al número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

55 "Medio complejo": el término "medio complejo", según se usa en el presente documento, se refiere a un medio que contiene al menos un componente cuya identidad o cantidad es desconocida o no está controlada.

"Cultivo", "cultivo celular": estos términos, según se usan en este documento, se refieren a una población celular que se suspende en un medio (véase la definición de "medio", a continuación) en unas condiciones adecuadas para la

supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como será evidente para el experto habitual en la técnica, en ciertas formas de realización, estos términos, según se usan en este documento, se refieren a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que se suspende la población. En ciertas formas de realización, las células del cultivo celular comprenden células de mamífero.

5 "Medio definido": el término "medio definido", según se usa en el presente documento, se refiere a un medio en el que la composición del medio es tanto conocida como controlada.

10 "Cultivo semicontinuo": el término "cultivo semicontinuo", según se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos subsiguientes al comienzo del proceso de cultivo. Dichos componentes proporcionados comprenden típicamente componentes nutricionales que han sido agotados durante el proceso de cultivo. Adicionalmente o alternativamente, dichos componentes adicionales pueden incluir componentes complementarios (véase la definición de "componentes complementarios", a continuación). En ciertas formas de realización, los componentes adicionales son proporcionados en un medio alimenticio (véase la definición de "medio alimenticio", a continuación). Un cultivo semicontinuo se detiene típicamente en el mismo punto, y las células y/o los componentes del medio son recogidos y opcionalmente purificados.

15 "Medio alimenticio": el término "medio alimenticio", según se usa en el presente documento, se refiere a una disolución que contiene nutrientes que nutren a las células de mamífero en crecimiento, que son añadidos después de comenzar el cultivo celular. Un medio alimenticio puede contener componentes idénticos a los proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. Alternativamente, un medio alimenticio puede contener uno o más componentes adicionales además de los proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. Adicionalmente o alternativamente, un medio alimenticio puede carecer de uno o más de los componentes que fueron proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. En ciertas formas de realización, uno o más componentes de un medio alimenticio se proporcionan a unas concentraciones o niveles idénticos o similares a las concentraciones o niveles a los que se proporcionaron esos componentes en el medio de cultivo celular inicial. En ciertas formas de realización, uno o más componentes de un medio alimenticio son proporcionados a unas concentraciones a niveles diferentes a las concentraciones a niveles a las que se proporcionaron esos componentes en el medio de cultivo celular inicial fueron proporcionados. Algunos ejemplos de medios alimenticios se muestran en la Tabla 2, aunque la presente invención no está limitada al uso de estos medios. El experto habitual en la técnica reconocerá que pueden usarse medios alimenticios alternativos y/o pueden realizarse ciertas modificaciones en las composiciones de los medios alimenticios ejemplares mencionados en la Tabla 2. En ciertas formas de realización, un medio alimenticio contiene componentes complementarios (véase la definición de "componentes complementarios" a continuación).

20 "Fragmento": el término "fragmento", según se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que se define como cualquier porción aislada de un polipéptido dado que es única o característica de ese polipéptido. Por ejemplo, el término, según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier porción de un polipéptido dado que incluye al menos un elemento de secuencia establecido encontrado en el polipéptido completo. En ciertos fragmentos, el elemento de secuencia abarca al menos 4 - 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido completo. Alternativamente o adicionalmente, el término, según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier porción aislada de un polipéptido dado que conserva al menos una fracción de al menos una actividad del polipéptido completo. En ciertas formas de realización, la fracción de actividad conservada es al menos el 10% de la actividad del polipéptido completo. En ciertas formas de realización, la fracción de actividad conservada es de al menos el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la actividad del polipéptido completo. En ciertas formas de realización, la fracción de actividad conservada es de al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de la actividad del polipéptido completo. En ciertas formas de realización, el fragmento conserva el 100% o más de la actividad del polipéptido completo. En ciertas formas de realización, un fragmento de la presente invención contiene una secuencia peptídica que sirve como sitio de glucosilación. En algunas formas de realización, un fragmento de la presente invención contiene una porción de un sitio de glucosilación tal que, cuando se une a otro fragmento que contiene la otra porción del sitio de glucosilación, se reconstituye un sitio de glucosilación funcional.

25 "Gen": el término "gen", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, de ADN o de ARN, al menos alguna porción de las cuales codifica un producto final aislado, típicamente, pero no se limita a, un polipéptido, que funciona en algún aspecto del metabolismo o el desarrollo celulares. Opcionalmente, el gen comprende no sólo la secuencia codificante que codifica el polipéptido u otro producto final discreto, sino que también comprende las regiones precedentes y/o posteriores a la secuencia codificante que modulan el nivel de expresión basal (véase la definición de "elemento de control genético" a continuación), y/o secuencias interviniendo ("intrones") entre segmentos codificantes individuales ("exones").

30 "Elemento de control genético": el término "elemento de control genético", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier elemento de una secuencia que modula la expresión de un gen al que está unida operativamente. Los elementos de control genético pueden funcionar aumentando o disminuyendo el nivel de expresión, y pueden ubicarse antes, dentro o después de la secuencia codificante. Los elementos de control genético pueden actuar en cualquier etapa de la expresión génica mediante la regulación de, por ejemplo, el inicio, la elongación o la terminación de la transcripción, el corte y empalme del ARNm, la corrección del ARNm, la

estabilidad del ARNm, la localización del ARNm dentro de la célula, el inicio, la elongación o la terminación de la traducción, o cualquier otra etapa de la expresión génica. Los elementos de control genético pueden funcionar individualmente o combinados entre sí.

5 "Glucoproteína": el término "glucoproteína", según se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o a un polipéptido que contiene una o más cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Las cadenas de oligosacáridos pueden estar formadas por un único residuo de azúcar, una única cadena no ramificada de residuos de azúcar o pueden estar formadas por una cadena de residuos de azúcar que se ramifica una o más veces. En ciertas formas de realización, las cadenas de oligosacáridos están unidas por N. En ciertas formas de realización, las cadenas de oligosacáridos están unidas por O.

10 "Patrón de glucosilación": el término "patrón de glucosilación" se refiere a la glucosilación observada en una glucoproteína o glucoproteínas dadas. Se dice que una glucoproteína con un mayor número de residuos de azúcar unidos covalentemente en la cadena de oligosacáridos tiene un patrón de glucosilación aumentado o más amplio. Por el contrario, se dice que una glucoproteína con menos residuos de azúcar unidos covalentemente en la cadena de oligosacáridos tiene un patrón de glucosilación disminuido o menos amplio. El término "patrón de glucosilación" según se usa en este documento también se refiere a una distribución característica de varios patrones de glucosilación diferentes en glucoproteínas individuales, expresado según las enseñanzas de la presente invención. En este sentido, un patrón de glucosilación aumentado significa un aumento en la distribución característica de los patrones de glucosilación de las glucoproteínas expresadas.

20 "Célula hospedadora": el término "célula hospedadora", según se usa en el presente documento, se refiere a una célula que es manipulada según la presente invención para que produzca una glucoproteína con un patrón de glucosilación deseable, según se describe en este documento. En algunas formas de realización, una célula hospedadora es una célula de mamífero.

25 "Hibridoma": el término "hibridoma", según se usa en el presente documento, se refiere a una célula o a la progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de un anticuerpo. Dicho hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el hibridoma pueden proceder de cualquier fuente de mamífero, incluyendo, pero no limitándose a, rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y ser humano. En ciertas formas de realización, un hibridoma es una línea celular de trioma que se produce cuando se fusiona la progenie del mieloma heterohíbrido, que es el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, y subsiguientemente se fusionan con una célula plasmática. En ciertas formas de realización, un hibridoma es cualquier línea celular de hibridoma inmortalizada que produce anticuerpos, tal como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein y col., Nature, 537: 3053, 1983).

35 "Medio", "medio de cultivo celular", "medio de cultivo": estos términos, según se usan en este documento, se refieren a una disolución que contiene nutrientes que alimentan las células de mamífero en crecimiento. Típicamente, dichas disoluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para un crecimiento mínimo y/o la supervivencia. Dicha disolución también puede contener componentes complementarios (véase la definición de "componentes complementarios", a continuación) para el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluyendo, pero no limitándose a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, algunos iones en particular (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a unas concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas formas de realización, un medio se formula ventajosamente a un pH y una concentración salina óptimos para la supervivencia y la proliferación celulares. Algunos ejemplos de medios de cultivo se muestran en la Tabla 1, aunque la presente invención no se limita al uso de estos medios. El experto habitual en la técnica reconocerá que puede usarse un medio de cultivo alternativo y/o pueden realizarse ciertas modificaciones en las composiciones de los medios de cultivo ejemplares mencionados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, un medio es un medio alimenticio que se añade después del inicio del cultivo celular (véase la definición de "medio alimenticio" anterior).

50 "Polipéptido": el término "polipéptido" según se usa en este documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero el experto habitual en la técnica comprenderá que el término no se limita a cadenas largas, y que puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos entre sí mediante un enlace peptídico. Como saben los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, un polipéptido puede ser glucosilado (véase la definición de "glucoproteína" anterior).

55 "Proteína": el término "proteína", según se usa en el presente documento, se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad aislada. Si un único polipéptido es la unidad de funcionamiento aislada y no requiere una asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos con objeto de formar la unidad de funcionamiento aislada, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse de forma intercambiable. Si la unidad funcional aislada está formada por más de un polipéptido que se asocia físicamente con otro, el término "proteína" se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan conjuntamente como la unidad

aislada.

"Glucoproteína expresada recombinantemente" y "glucoproteína recombinante": estos términos según se usan en este documento se refieren a una glucoproteína expresada en una célula hospedadora que ha sido manipulada por la mano del hombre para que exprese esa glucoproteína. En ciertas formas de realización, una célula hospedadora es una célula de mamífero. En ciertas formas de realización, dicha manipulación comprende una o más modificaciones genéticas. Por ejemplo, las células hospedadoras de mamífero pueden modificarse genéticamente mediante la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican para la expresión de una glucoproteína. La glucoproteína heteróloga expresada recombinantemente puede ser idéntica o similar a las glucoproteínas que se expresan normalmente en la célula hospedadora de mamífero. La glucoproteína heteróloga expresada recombinantemente también puede ser foránea a la célula hospedadora, es decir, heteróloga de las glucoproteínas que se expresan normalmente en la célula hospedadora de mamífero. En ciertas formas de realización, una glucoproteína heteróloga expresada recombinantemente es quimérica en aquellas porciones de la glucoproteína que contienen secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a las glucoproteínas expresadas normalmente en la célula hospedadora de mamífero, mientras que otras porciones son forneas a la célula hospedadora. Alternativamente, una célula hospedadora de mamífero puede modificarse genéticamente mediante la activación o la regulación por incremento de uno o más genes endógenos.

"Componentes complementarios": el término "componentes complementarios", según se usa en el presente documento, se refiere a componentes que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluyendo, pero no limitándose a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, algunos iones en particular (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a unas concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas formas de realización, los componentes complementarios pueden ser añadidos al cultivo celular inicial. En ciertas formas de realización, los componentes complementarios pueden ser añadidos tras el comienzo del cultivo celular.

"Título": el término "título", según se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total de glucoproteína expresada recombinantemente producida por un cultivo de células de mamífero en una cantidad dada de volumen de medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de glucoproteína por mililitro de medio.

Descripción detallada de ciertas formas de realización

La presente invención proporciona sistemas mejorados para la producción de glucoproteínas en un cultivo celular. En particular, se proporcionan sistemas que dan como resultado la producción de una glucoproteína que contiene un patrón de glucosilación deseable. Por ejemplo, una glucoproteína puede tener un patrón de glucosilación más amplio y/o puede tener una distribución de las cadenas de oligosacáridos que se parezca más a la distribución de las cadenas de oligosacáridos aplicada a la glucoproteína por la célula hospedadora natural. En algunas formas de realización, el uso de los sistemas inventivos puede dar como resultado la producción de una glucoproteína con un patrón de glucosilación similar o idéntico al patrón de glucosilación que habría presente si la glucoproteína fuera expresada en una célula humana endógena. Ciertas formas de realización de la invención se analizan con detalle a continuación. Los expertos habituales en la técnica comprenderán, sin embargo, que varias modificaciones de estas formas de realización están en el ámbito de las reivindicaciones anexas. Son las reivindicaciones y los equivalentes de las mismas las que definen el ámbito de la presente invención, que no está ni debería interpretarse como limitada a o por esta descripción de ciertas formas de realización.

Composiciones de medios

Puede usarse una amplia variedad de medios de crecimiento de mamífero según la presente invención. En ciertas formas de realización, las células pueden cultivarse en uno de los diversos medios definidos químicamente, en los que los componentes del medio son tanto conocidos como controlados. En ciertas formas de realización, las células pueden cultivarse en un medio complejo, en el que no todos los componentes del medio son conocidos ni/o controlados.

En las últimas décadas se han desarrollado ampliamente y publicado medios de crecimiento definidos químicamente para el cultivo de células de mamífero. Todos los componentes del medio definido están bien caracterizados, y los medios así definidos no contienen aditivos complejos tales como suero o hidrolizados. Se desarrollaron formulaciones tempranas de medios para permitir al crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad con pocas o ningunas preocupaciones por la producción de proteínas. Más recientemente se han desarrollado formulaciones de medios con el fin expreso de sustentar cultivos celulares altamente productores de proteínas recombinantes y/o de glucoproteínas.

Los medios definidos consisten típicamente en aproximadamente 50 entidades químicas de concentraciones conocidas en agua. La mayoría de ellos también contienen una o más proteínas bien caracterizadas tales como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, o no requieren componentes proteicos y por lo tanto se denominan medios definidos exentos de proteínas. Los componentes químicos del medio se dividen en cinco amplias categorías: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos y una categoría miscelánea que se resiste a una

clasificación clara.

Los oligoelementos consisten en una diversidad de sales inorgánicas incluidas a nivel micromolar o inferior. Los cuatro oligoelementos incluidos más habitualmente presentes en prácticamente todos los medios definidos son hierro, cinc, selenio y cobre. El hierro (sales ferrosas o férricas) y el cinc se añaden típicamente en concentraciones micromolares. Los numerosos oligoelementos menos comunes se añaden habitualmente a concentraciones nanomolares.

El manganeso se incluye frecuentemente entre los oligoelementos como un catión divalente ($MnCl_2$ o $MnSO_4$). En versiones más tempranas de los medios definidos, o bien se omitía o bien se incluía a una elevada concentración del orden de 1 mM (véanse, por ejemplo, Barnes y Sato, 1980 [Medio DMEM/F12] y Kitos y col., 1962 [Medio MD 705/1]). En los medios definidos desarrollados más recientemente, el manganeso se ha incluido habitualmente, pero a unas concentraciones mucho menores, por ejemplo, en el intervalo de 1 - 5 nM (véanse, por ejemplo, Hamilton y Ham, 1977 [Medio MCDB 301] y Cleveland y Erlanger, 1988 [medio sin nombre]).

La presente invención engloba el hallazgo de que las glucoproteínas producidas por un cultivo de células cultivadas en medios definidos que contienen unas concentraciones de manganeso entre estos extremos, contienen unos patrones de glucosilación más amplios de los que tendrían si las células hubieran crecido en medios tradicionales, tales como los descritos anteriormente. En ciertas formas de realización, el manganeso es aportado al medio a una concentración de entre aproximadamente 10 y 600 nM. En ciertas formas de realización, el manganeso es aportado al medio a una concentración de entre aproximadamente 20 y 100 nM. En ciertas formas de realización el manganeso es aportado al medio a una concentración de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590 ó 600 nM, o en cualquier intervalo dentro de estas concentraciones. La presente invención también incluye el hallazgo de que las glucoproteínas producidas por un cultivo de células cultivadas en un medio definido que contiene unos niveles relativamente bajos de glutamina contienen unos patrones de glucosilación más amplios de los que tendría si las células hubieran crecido en un medio tradicional que contiene unos mayores niveles de glutamina. En ciertas formas de realización, el nivel inicial de glutamina en el medio es menor o igual a aproximadamente 8 mM. En ciertas formas de realización, el nivel inicial de glutamina en el medio es menor o igual a aproximadamente 4 mM.

El experto habitual en la técnica será capaz de elegir la concentración exacta de manganeso dentro de estos intervalos inventivos basándose en los atributos particulares de su diseño experimental, incluyendo el carácter de las células en las que se expresa la glucoproteína, el carácter de la glucoproteína que se va a producir y la presencia o ausencia de otros componentes en el medio en el que crecen las células. Por ejemplo, las diferencias entre estructuras unidas por N y unidas por O, o las diferencias entre estructuras de oligosacáridos particulares dentro de cada una de estas amplias clases pueden requerir diferentes concentraciones de manganeso en el medio de crecimiento con objeto de producir unas cadenas de oligosacáridos más amplias y/o más naturales.

Glucoproteínas

Según las presentes enseñanzas puede producirse cualquier glucoproteína que sea expresable en una célula hospedadora. Una glucoproteína puede ser expresada a partir de un gen que sea endógeno de la célula hospedadora, o a partir de un gen heterólogo que es introducido en la célula hospedadora. Una glucoproteína puede ser una que se produce en la naturaleza, o alternativamente tener una secuencia que ha sido diseñada genéticamente o elegida por la mano del hombre. Una glucoproteína que se va a producir puede ser ensamblada a partir de fragmentos de polipéptidos que aparecen en la naturaleza, al menos uno de los cuales contenga una secuencia peptídica que sirva como un sitio de glucosilación. Alternativamente, cada fragmento de polipéptido puede tener únicamente una porción de un sitio de glucosilación, sitio que es reconstituido tras el ensamblaje de los fragmentos de polipéptidos. Adicionalmente o alternativamente, la glucoproteína diseñada genéticamente puede incluir uno o más fragmentos que no son naturales, siempre que la glucoproteína diseñada genéticamente contenga al menos una secuencia peptídica que sirva como sitio de glucosilación.

Las glucoproteínas que pueden ser expresadas deseablemente según la presente invención se elegirán a menudo sobre la base de una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención puede emplearse para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor de regulación, antígeno, agente de unión etc., farmacéutica o comercialmente relevante. La siguiente lista de glucoproteínas que pueden ser producidas según la presente invención tiene una naturaleza meramente ejemplar, y no pretende ser una enumeración limitante. El experto habitual en la técnica comprenderá que cualquier glucoproteína puede ser expresada según la presente invención y será capaz de elegir la glucoproteína en particular que se va a producir basándose en sus necesidades particulares.

Factores de coagulación

Se ha demostrado que los factores de coagulación son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales. Dada la importancia de los factores de coagulación recombinantes en el tratamiento de enfermedades tales como la

hemofilia, la optimización del patrón de glucosilación de los factores de coagulación producidos recombinantemente según la presente invención es de particular interés. Por ejemplo, el factor de coagulación IX (Factor IX, o "FIX") es una glucoproteína de cadena única cuya deficiencia da como resultado la hemofilia B, una alteración en la que la sangre del paciente es incapaz de coagular. Por lo tanto, cualquier pequeña herida que produzca una hemorragia es potencialmente una circunstancia mortal.

El FIX es sintetizado como un zimógeno de cadena única que puede ser activado a una serinproteasa bicatenaria (Factor IXa) mediante la liberación de un péptido de activación. El dominio catalítico del Factor IXa está ubicado en la cadena pesada (véase Chang y col., J. Clin. Invest., 100: 4, 1997, incorporado a este documento como referencia). El FIX tiene múltiples sitios de glucosilación que incluyen carbohidratos tanto unidos por N como por O. Se pensaba que una estructura en particular unida por O a la Serina 61 (Sia- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O-Ser) era única del FIX, pero desde entonces se ha encontrado en otras pocas moléculas, incluyendo la proteína Notch en mamíferos y en *Drosophila* (Maloney y col., Journal of Biol. Chem., 275 (13), 2000). El FIX producido por las células de ovario de hámster chino ("CHO") en cultivo celular muestra una cierta variabilidad en la cadena de oligosacáridos de la Serina 61. Estas diferentes glucoformas, y otras potenciales glucoformas, pueden tener diferentes capacidades para inducir la coagulación cuando se administran a seres humanos o a animales y/o pueden tener diferentes estabildades en la sangre, dando como resultado una coagulación menos eficaz.

La hemofilia A, que es clínicamente indistinguible de la hemofilia B, está causada por un defecto en el factor de coagulación humano VIII, otra glucoproteína que es sintetizada como un zimógeno de cadena única y después procesada en una forma activa bicatenaria. La presente invención también puede emplearse para controlar o modificar el patrón de glucosilación del factor de coagulación VIII con objeto de modular su actividad coaguladora. Otros factores de coagulación glucoproteicos que pueden ser producidos y cuyo patrón de glucosilación puede ser controlado o modificado según la presente invención incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, el factor tisular y el factor de von Willebrand.

Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en particular. Dado el gran número de anticuerpos usados actualmente o en investigación como agentes farmacéuticos u otros productos comerciales, la producción de anticuerpos con unos patrones de glucosilación deseables según la presente invención es de particular interés. Adicionalmente, puede ser menos probable que los anticuerpos con unos patrones de glucosilación diferentes inicien una respuesta inmunitaria en el individuo en el que se administran, dando como resultado un régimen terapéutico más eficaz. Adicionalmente o alternativamente, los anticuerpos con patrones de glucosilación diferentes en sus regiones constantes pueden mostrar una función efectora farmacocinética o farmacodinámica mejorada. Adicionalmente o alternativamente, los anticuerpos con patrones de glucosilación diferentes pueden ser más estables en las condiciones de cultivo celular en las que son producidos, por ejemplo, por ser más resistentes a las proteasas o a otros componentes del cultivo celular, de forma que se produce un título final de anticuerpo mayor.

Según las enseñanzas de la presente desvelación puede usarse cualquier anticuerpo que pueda ser expresado en una célula hospedadora. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal. En ciertas formas de realización, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, una rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se ha descrito una variedad de metodologías para elaborar anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81, 6851, 1985; Takeda y col., Nature 314, 452, 1985, Cabilly y col., Patente de EE.UU. Nº 4.816.567; Boss y col., Patente de EE.UU. Nº 4.816.397; Tanaguchi y col., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B).

En algunas formas de realización, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico en el que la gran mayoría de los residuos de aminoácidos derivan de anticuerpos humanos, minimizando así cualquier potencial reacción inmunitaria cuando es administrado a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos de la región hipervariable son sustituidos por residuos de una especie no humana que confieren una especificidad o afinidad de antígeno deseada. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento o superior a un anticuerpo humano. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado está optimizado mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones en la secuencia consenso, sustituciones en la línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina modificadas pueden elaborarse mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la técnica, (por ejemplo, Teng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80, 7308 - 7312, 1983; Kozbor y col., Immunology Today, 4, 7279, 1983; Olsson y col., Meth. Enzymol., 92, 3 - 16.1982). En algunas formas de realización, las moléculas de inmunoglobulina modificadas se elaboran según las enseñanzas de la Publicación PCT WO92/06193 o del documento EP 0239400.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo producido según las enseñanzas de la presente desvelación puede

contener una región constante de una inmunoglobulina o Fc que muestre un patrón de glucosilación mejorado. Por ejemplo, un anticuerpo producido según las enseñanzas de este documento puede unirse más fuertemente o con más especificidad a moléculas efectoras tales como el complemento y/o receptores de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo tales como la actividad de células efectoras, la lisis, la actividad mediada por el complemento, la eliminación del anticuerpo y la semivida del anticuerpo. Los receptores típicos de Fc que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, de un anticuerpo de IgG) incluyen, pero no se limitan a, receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII y FcRn, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores de Fc se han revisado en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457 - 92, 1991; Capel y col., *Immunomethods* 4: 25 - 34, 1994; y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330 - 41, 1995,

Como un ejemplo, aunque no limitante, un anticuerpo que puede ser producido según las presentes enseñanzas es un anticuerpo anti-ABeta. Los anticuerpos anti-ABeta son una potencial vía particularmente prometedora de terapia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad progresiva que produce demencia senil (véanse, de forma general: Selkoe, *TINS* 16: 403, 1993; Hardy y col., documento WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53: 438, 1994; Duff y col., *Nature* 373: 476, 1995; Games y col., *Nature* 373: 523, 1995). Hablando ampliamente, la enfermedad entra en dos categorías: inicio tardío, que se produce en la edad anciana (más de 65 años) e inicio temprano, que se desarrolla bastante antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y los 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma pero las anomalías tienden a ser más graves y a estar más extendidas en los casos que comienzan en una etapa más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, ovillos neurofibrilares y placas seniles. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de microtúbulos asociados a la proteína tau que consisten en dos filamentos enrollados entre sí por parejas. Las placas seniles (es decir, las placas amiloides) son áreas de neuropilos desorganizados de hasta 150 μ m de ancho con depósitos de amiloides extracelulares en el centro que son visibles mediante un análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas amiloides en el cerebro también se asocia con el síndrome de Down y con otros trastornos cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido denominado ABeta o péptido Beta-amiloide. El péptido ABeta es un fragmento interno de 4 kDa de 39 - 43 aminoácidos de una glucoproteína transmembranal denominada proteína precursora amiloide (APP). Como resultado del procesado proteolítico de la APP por parte de diferentes enzimas secretasas, el ABeta se encuentra principalmente tanto en una forma corta, de 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que varía entre 42 - 43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembranal hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi del ABeta, y puede justificar la capacidad del ABeta de agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas amiloides en el cerebro produce finalmente la muerte de las células neuronales. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neurológico caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

Varias mutaciones en la proteína APP se han correlacionado con la presencia de la enfermedad de Alzheimer (véanse, por ejemplo, Goate y col., *Nature* 349: 704, 1991 (de la valina 717 a la isoleucina); Chartier Harlan y col. *Nature* 353: 844, 1991 (de la valina 717 a la glicina); Murrell y col., *Science* 254: 97, 1991 (de la valina 717 a la fenilalanina); Mullan y col., *Nature Genet.* 1: 345, 1992 (una mutación doble que modifica la lisina 595 - metionina 596 por asparragina 595 - leucina 596). Se cree que dichas mutaciones provocan la enfermedad de Alzheimer mediante un procesado aumentado o alterado de la APP al ABeta, particularmente un procesado de la APP a cantidades aumentadas de la forma larga del ABeta (es decir, ABeta 1 - 42 y ABeta 1 - 43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de la presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente al procesado de la APP generando unas cantidades aumentadas de la forma larga del ABeta (véase, Hardy, *TINS* 20: 154, 1997).

Se han usado con éxito modelos de ratón para determinar la importancia de las placas amiloides en el Alzheimer (Games y col., *supra*; Johnson-Wood y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 1550, 1997). En particular, cuando se inyectan ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de la APP humana y desarrollan la enfermedad de Alzheimer en una edad joven) con la forma larga del ABeta, muestran tanto una disminución en la progresión del Alzheimer como un aumento en los títulos de anticuerpo contra el péptido ABeta (Schenk y col., *Nature* 400, 173, 1999). Las observaciones analizadas anteriormente indican que el ABeta, particularmente en su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

El péptido ABeta puede existir en disolución y puede ser detectado en el SNC (por ejemplo, en el LCR) y en plasma. En ciertas condiciones, el ABeta soluble es transformado en formas en lámina Beta fibrilares y tóxicas encontradas en las placas neuríticas y en los vasos sanguíneos cerebrales de pacientes con AD. Se han investigado tratamientos que implican la inmunización con anticuerpos monoclonales contra el ABeta. Se ha ensayado tanto la inmunización activa como pasiva en modelos de ratón con AD. La inmunización activa dio como resultado una cierta reducción en la carga de placas en el cerebro, pero sólo mediante administración nasal. También se ha investigado la inmunización pasiva de ratones transgénicos PDAPP (Bard, y col., *Nat. Med.* 6: 916 - 19, 2000). Se averiguó que los anticuerpos que reconocen los dominios amino terminal y central del ABeta estimulaban la fagocitosis de los depósitos de ABeta, mientras que los anticuerpos contra los dominios próximos al carboxi terminal no lo hacían.

El mecanismo de eliminación del ABeta tras la inmunización pasiva activa está en investigación continua. Se han propuesto dos mecanismos para la eliminación eficaz, es decir, la degradación central y la degradación periférica. El

mecanismo de degradación central se basa en que los anticuerpos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, unirse a las placas e inducir la eliminación de las placas preexistentes. Se ha demostrado que la eliminación es promovida a través de una fagocitosis mediada por un receptor de Fc (Bard, y col., *supra*). El mecanismo de degradación periférica para la eliminación del ABeta se basa en una alteración del equilibrio dinámico del ABeta entre el cerebro, el LCR y el plasma tras la administración del anticuerpo, dando lugar al transporte del ABeta desde un compartimento al otro. El ABeta derivado centralmente es transportado en el LCR y el plasma, donde es degradado. Estudios recientes han concluido que el ABeta soluble y no unido está implicado en el deterioro de la memoria asociado con la AD, incluso sin una reducción en el depósito amiloide en el cerebro. Se requieren estudios adicionales para determinar la acción y/o la interacción de estas vías para la eliminación del ABeta (Dodel, y col., *The Lancet* Vol. 2: 215, 2003). Los anticuerpos anti-ABeta son una vía potencialmente prometedora de tratamiento de la AD dado que pueden unirse y eliminar el ABeta u otros componentes que forman las placas amiloides. Los anti-ABeta producidos según las enseñanzas de la presente desvelación pueden servir para tratar mejor el Alzheimer u otras enfermedades relacionadas, por ejemplo, mediante la unión y la eliminación de los componentes de las placas amiloides más eficazmente, mediante la eliminación de las placas amiloides con pocos o menos efectos secundarios graves, o impidiendo la formación o la creación de placas amiloides. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas son anticuerpos monoclonales.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen específicamente a la forma agregada del ABeta sin unirse a la forma soluble. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen específicamente a la forma soluble de los anti-ABeta en unas condiciones en las que no se unen a la forma agregada. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen tanto a la forma agregada como a la soluble. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen al ABeta en las placas. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas atraviesan la barrera hematoencefálica. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas reducen la carga amiloide en un sujeto. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas reducen la distrofia neurítica en un sujeto. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta pueden mantener la arquitectura sináptica (por ejemplo, sinaptofisina).

Según algunas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen a un epítipo en los residuos 13 - 28 del ABeta (con el primer residuo N terminal del ABeta natural designado como 1). En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen a un epítipo en los residuos 19 - 22 del ABeta. En algunas formas de realización, se usan anticuerpos monoclonales múltiples con unas especificidades de unión para epítopos anti-ABeta diferentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se coadministra un anticuerpo específico para un epítipo de los residuos 19 - 22 del ABeta con un anticuerpo específico para un epítipo fuera de los residuos 19 - 22 del ABeta. Dichos anticuerpos pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. También pueden usarse anticuerpos contra componentes amiloides distintos al ABeta (por ejemplo, administrarse o coadministrarse).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-ABeta producidos según las presentes enseñanzas se unen a un epítipo de ABeta más fuertemente o con más especificidad que los anticuerpos anti-ABeta producidos de otro modo. La especificidad de epítipo de un anticuerpo puede determinarse mediante técnicas conocidas, por ejemplo, mediante la formación de una genoteca de expresión de fagos en la que los diferentes miembros muestran diferentes subsecuencias del ABeta. Después pueden seleccionarse los miembros de la genoteca de expresión de fagos que se unen específicamente al anticuerpo que se está probando. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, dicha familia contiene una secuencia de núcleo común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia de núcleo más corta, que muestra una unión específica al anticuerpo, define típicamente un epítipo unido por el anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, puede ensayarse la especificidad de epítipo de los anticuerpos en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epítipo ya ha sido determinada. Por ejemplo, se considera que los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 15C11 por la unión al ABeta se unen al mismo epítipo o a uno similar que el 15C11, es decir, en los residuos de ABeta 19 - 22. En ciertas formas de realización, el cribado de anticuerpos para la especificidad de epítipo es un pronóstico de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, es probable que un anticuerpo determinado que se une a un epítipo de los residuos 13 - 28 (por ejemplo, a A β 19 - 22) del ABeta sea eficaz en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer según las metodologías de la presente invención.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un segmento preferido del ABeta sin unirse a otras regiones del ABeta tienen varias ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o a sueros policlonales contra el ABeta intacto. Entre otras cosas, para unas dosis de masa iguales, las dosis de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una mayor dosis molar de anticuerpos eficaces para la eliminación de las placas amiloides. También, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra los depósitos amiloides sin inducir una respuesta de eliminación contra el polipéptido de APP intacto, reduciendo así los potenciales efectos secundarios.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos monoclonales, quiméricos, de cadena única o humanizados

descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no aparecen de forma natural en ningún anticuerpo de ninguna especie en la naturaleza. Dichos residuos foráneos pueden utilizarse, por ejemplo, para conferir una especificidad nueva o modificada, una afinidad o función efectora del anticuerpo monoclonal, quimérico, de cadena única o humanizado.

5 *Enzimas*

Otra clase de glucoproteínas que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluye las enzimas. Las enzimas pueden ser glucoproteínas cuyos patrones de glucosilación afectan a la actividad enzimática. Por lo tanto, la producción de enzimas con unos patrones de glucosilación deseables según la presente invención también es de particular interés.

- 10 Como un ejemplo no limitante, una deficiencia en la glucocerebrosidasa (GCR) da como resultado una dolencia conocida como enfermedad de Gaucher, que está provocada por una acumulación de glucocerebrosidasa en los lisosomas de ciertas células. Los sujetos con enfermedad de Gaucher muestran un conjunto de síntomas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, alteraciones esqueléticas, trombocitopenia y anemia. Friedman y Hayes demostraron que la GCR recombinante (rGCR) que contiene una única sustitución en la secuencia primaria de
- 15 aminoácidos mostraba un patrón de glucosilación modificado, específicamente un aumento en los residuos de fucosa y N-acetil glucosamina en comparación con la GCR natural (véase la Patente de EE.UU. número 5.549.892).

Friedman y Hayes también demostraron que esta rGCR mostraba unas propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la rGCR natural. Por ejemplo, aproximadamente tantas como el doble de rGCR se dirigieron a las células de Kupffer hepáticas de lo que lo hicieron las GCR naturales. Aunque las secuencias de aminoácidos primarias de las dos proteínas diferían en un único residuo, Friedman y Hayes formularon la hipótesis de que el patrón de glucosilación modificado de la rGCR también puede afectar al direccionamiento hacia las células de Kupffer.

20

El experto habitual en la técnica estará al tanto de otros ejemplos conocidos de enzimas que muestran unas propiedades enzimáticas, farmacocinéticas y/o farmacodinámicas modificadas resultantes de una modificación en sus patrones de glucosilación.

25

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

Otra clase de glucoproteínas que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Por lo tanto, la producción de receptores con unos patrones de glucosilación deseables según la presente invención también es de particular interés. Los factores de crecimiento son típicamente glucoproteínas que son secretadas por las células que se unen a los receptores de otras células, activándolos e iniciando un cambio metabólico o de desarrollo en la célula receptora.

30

Algunos ejemplos no limitantes de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización de mamíferos incluyen citocinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) tales como FGF-5; factores de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide; proteínas CD tal como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; proteínas morfogenéticas óseas (BMPs); interferones, tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; la mayoría de las interleucinas; factor de necrosis tumoral (TNF) beta; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); factor de crecimiento hematopoyético; y encefalinas. El experto habitual en la técnica estará al tanto de otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que pueden ser expresados según la presente invención.

35

40

Se ha demostrado que unas modificaciones específicas en el patrón de glucosilación de factores de crecimiento o de otras moléculas de señalización tienen efectos drásticos sobre sus propiedades terapéuticas. Como un ejemplo no limitante, un procedimiento habitual de tratamiento de pacientes que padecen anemia crónica es proporcionarles inyecciones frecuentes de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) con objeto de estimular su producción de glóbulos rojos. Se ha desarrollado un análogo de la rHuEPO, la darbepoyetina alfa (Aranesp®), con una duración mayor en el cuerpo que la rHuEPO normal. La principal diferencia entre la darbepoyetina alfa y la rHuEPO es la presencia de dos cadenas adicionales de oligosacáridos unidas por N que contienen ácido siálico. La producción de la darbepoyetina alfa se ha conseguido mediante el uso de glucoingeniería *in vitro* (véase, Elliott y col., Nature Biotechnology 21 (4): 414 - 21, 2003). Elliott y col. usaron una mutagénesis *in vitro* para incorporar sitios adicionales de glucosilación en el esqueleto polipeptídico de la rHuEPO, dando como resultado la expresión de un análogo de la darbepoyetina alfa. Las cadenas adicionales de oligosacáridos están ubicadas distalmente al sitio de unión del receptor de la EPO y aparentemente no interfieren con la unión al receptor. Sin embargo, la semivida de la darbepoyetina alfa es hasta tres veces superior que la de la rHuEPO, dando como resultado un agente terapéutico mucho más eficaz. Este ejemplo demuestra que las modificaciones en el patrón de glucosilación de un factor de crecimiento o de otras moléculas de señalización pueden tener efectos drásticos sobre la estabilidad y/o la actividad

45

50

55

in vivo de una glucoproteína terapéutica. Por lo tanto, la expresión de un factor de crecimiento o de otra molécula de señalización de interés según las enseñanzas de la presente invención pueden dar como resultado un factor de crecimiento o una molécula de señalización expresados con un patrón de glucosilación mejorado y unas propiedades terapéuticas mejoradas.

5 Receptores

Otra clase de glucoproteínas que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales son los receptores. Por lo tanto, la producción de receptores con patrones de glucosilación deseables según la presente invención es también de particular interés. Los receptores son típicamente glucoproteínas transmembranales que funcionan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Además del dominio de reconocimiento del ligando, los receptores tienen a menudo un dominio de cinasa de proteína que inicia una vía de señalización mediante la fosforilación de moléculas objetivo intracelulares tras la unión del ligando, produciendo unos cambios de desarrollo o metabólicos dentro de la célula.

En ciertas formas de realización, el receptor glucoproteico que se va a producir según la presente invención es un receptor de tirosincinasa (RTK). La familia de los RTK incluye receptores que son cruciales para varias funciones de numerosos tipos celulares (véanse, por ejemplo, Yarden y Ullrich, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 433 - 478, 1988; Ullrich y Schlessinger, *Cell* 61: 243 - 254, 1990, incorporado a este documento como referencia). Algunos ejemplos no limitantes de RTK incluyen miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptores de tirosincinasa con dominios de homología 1 (TIE-1) y TIE-2 de inmunoglobulina y EGF (Sato y col., *Nature* 376 (6535): 70 - 74, 1995) y el receptor de c-Met, se ha sugerido que algunos de los cuales promueven la angiogénesis, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, *J. Cell Biol.* 129: 895 - 898, 1995). Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen cinasa hepática fetal 1 (FLK-1) (a menudo denominado receptor que contiene un dominio con un inserto de cinasa (KDR) (Terman y col., *Oncogene* 6: 1677 - 83, 1991) o el receptor 2 del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGFR-2)), cinasa de tirosina 1 de tipo fms (Flt-1) (DeVries y col. *Science* 255: 989 - 991, 1992; Shibuya y col., *Oncogene* 5: 519 - 524, 1990), a veces denominado receptor 1 del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGFR-1), neuropilina-1, endogлина, endosalina y Axl. En ciertas formas de realización, los receptores alfa y beta del factor de necrosis tumoral (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo de 1991) son expresados según la presente invención (para una recapitulación, véase, Naismith y Sprang, *J. Inflamm.* 47 (1 - 2): 1 - 7, 1995 - 96).

En ciertas formas de realización, un receptor glucoproteico que se va a producir según la presente invención es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR). Los GPCR son glucoproteínas que tienen siete dominios transmembranales. Tras la unión de un ligando a un GPCR, se transduce una señal hacia el interior de la célula que da como resultado un cambio en una propiedad biológica o fisiológica de la célula. Los GPCR son un objetivo importante de la acción y el desarrollo de fármacos. De hecho, los receptores han conducido a más de la mitad de los fármacos conocidos actuales (Drews, *Nature Biotechnology*, 14: 1516, 1996) y los GPCR representan el objetivo más importante de intervención terapéutica, con un 30% de fármacos prescritos clínicamente para antagonizar o agonizar un GPCR (Milligan, G. y Rees, S., *TIPS*, 20: 118 - 124, 1999). Dado que la mayoría de los receptores tienen unos antecedentes establecidos y comprobados como agentes terapéuticos, la producción de GPCR con unos patrones de glucosilación deseables según la presente invención también es de particular interés. Por ejemplo, los dominios extracelulares de los GPCR con unos patrones de glucosilación deseables expresados según las enseñanzas de la presente invención podrían funcionar como importantes agentes terapéuticos mediante la combinación o el secuestro de un ligando cuya unión a un GPCR endógeno es perjudicial.

Los GPCR, junto con las proteínas G y los efectores (enzimas y canales intracelulares que son modulados por las proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de segundos mensajeros intracelulares con aportaciones extracelulares. Dichos genes y productos de los genes son los potenciales agentes causantes de enfermedad.

La superfamilia de proteínas GPCR contiene ahora más de 250 tipos de parálogos, receptores que presentan variantes generadas mediante duplicaciones génicas (u otros procesos), por oposición a los ortólogos, el mismo receptor de especies diferentes. Ahora la superfamilia puede subdividirse en cinco familias: la Familia I, receptores ejemplificados por el receptor de la rodopsina y el beta2-adrenérgico y actualmente representados por más 200 miembros únicos; la Familia II, la recientemente caracterizada familia de receptores de hormona paratiroidea / calcitonina / secretina; la Familia III, la familia de receptores metabotrópicos de glutamato en mamíferos; la Familia IV, la familia de receptores del AMPc, importante en la quimiotaxia y el desarrollo de *D. discoideum*; y la Familia V, los receptores de las feromonas de apareamiento fúngico tales como STE2.

Los GPCR incluyen receptores de aminos biógenas, de mediadores lipídicos de la inflamación, de hormonas peptídicas y de mediadores de señales sensoriales. El GPCR se activa cuando el receptor se une a su ligando extracelular. Los cambios conformacionales en el GPCR, que se producen tras la interacción ligando-receptor, afectan a la afinidad de unión de una proteína G a los dominios intracelulares del GPCR. Esto permite que el GTP se una con una afinidad aumentada a la proteína G.

La activación de la proteína G por el GTP conduce a la interacción de la subunidad α de la proteína G con la adenilato ciclasa u otros generadores de moléculas segundos mensajeros. Esta interacción regula la actividad de la adenilato ciclasa, y por lo tanto la producción de una molécula segundo mensajero, el AMPc. El AMPc regula la fosforilación y la activación de otras proteínas intracelulares. Alternativamente, los niveles celulares de otras moléculas segundos mensajeros, tales como el GMPc o los eicosanoides, pueden regularse por aumento o por disminución mediante la actividad de los GPCR. La subunidad α de la proteína G es desactivada mediante la hidrólisis del GTP por la GTPasa, y las subunidades α , $\beta\epsilon\tau\alpha$ y γ se reasocian. La proteína heterotrimérica G se disocia entonces de la ciclasa de adenilato u otros generadores de moléculas segundos mensajeros. La actividad del GPCR también puede ser regulada mediante la fosforilación de los dominios o bucles intra y extracelulares.

Los receptores de glutamato forman un grupo de GPCR que son importantes en la neurotransmisión. El glutamato es el principal un neurotransmisor del SNC y se cree que tiene importantes papeles en la plasticidad neuronal, la capacidad intelectual, la memoria, el aprendizaje y algunos trastornos neurológicos tales como la epilepsia, la apoplejía y la neurodegeneración (Watson, S. y S. Arkininstall, 1994, *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA, págs. 130 - 132). Estos efectos del glutamato están mediados por dos clases distintas de receptores denominados ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos contienen un canal de cationes intrínseco y median en las acciones de excitación rápida del glutamato. Los receptores metabotrópicos son moduladores, aumentando la excitabilidad de membrana de las neuronas mediante la inhibición de las conductancias de potasio dependientes de calcio y tanto inhibiendo como potenciando la transmisión excitadora de los receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos se clasifican en cinco subtipos basados en la farmacología agonista y en las vías de transducción de señales, y están ampliamente distribuidos en el tejido cerebral. La glucosilación unida por N ha demostrado ser importante en la función del receptor de glutamato metabotrópico humano de tipo 1 alfa (mGlu1alfa) (Mody y col., *Neuropharmacology* 38 (10): 1485 - 92, 1999). El mGlu1alfa se expresa normalmente, al menos en parte, como un dímero formado por monómeros de aproximadamente 145 y 160 KDa. Mediante el tratamiento del mGlu1alfa con tunicamicina, un potente inhibidor de la glucosilación unida por N, Mody y col. demostraron que, aunque la expresión en la superficie celular no estaba afectada, sólo se expresaba un único péptido con una masa de 130 kDa predicha por su secuencia de aminoácidos primaria. Funcionalmente, el tratamiento con tunicamicina reducía la hidrólisis de fosfoinosítido estimulada por agonistas en aproximadamente el 50% en comparación con las poblaciones celulares no tratadas. Por lo tanto, el ajuste de los patrones de glucosilación de los GPCR expresados según el presente sistema inventivo puede ser útil en la modulación de la función de señalización del GPCR expresado y potencialmente para controlar o afectar a las propiedades farmacéuticas u otras propiedades del GPCR expresado.

La familia del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) es un grupo de polipéptidos relacionados cuyas acciones también están mediadas por los GPCR. Los miembros clave de esta familia son el propio VIP, la secretina y el factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF). El VIP tiene un amplio perfil de acciones fisiológicas que incluyen la relajación de los músculos lisos, la estimulación a la inhibición de la secreción en diversos tejidos, la modulación de varias actividades celulares inmunitarias y diversas actividades excitadoras e inhibitoras en el SNC. La secretina estimula la secreción de enzimas e iones en el páncreas y el intestino, y también está presente en pequeñas cantidades en el cerebro. La glucosilación del receptor del VIP ha demostrado tener un importante efecto sobre la unión de su VIP análogo (Chochola y col., *J. Biol. Chem.* 268: 2312 - 2318, 1993). El bloqueo estérico de las cadenas de oligosacáridos mediante el tratamiento del receptor VIP con aglutinina de germen de trigo inhibió notablemente la unión al VIP de una forma dependiente de la dosis y redujo la respuesta del AMPc estimulada por el VIP. Adicionalmente, la mutación de los sitios de glucosilación específicos unidos por N en el receptor del VIP dio como resultado la retención del receptor en el retículo endoplásmico, lo que indicaba que una glucosilación apropiada era crítica para su suministro a la superficie de la célula (Couvineau y col., *Biochemistry* 35 (6): 1745 - 52, 1996). Por lo tanto, el ajuste de los patrones de glucosilación de los GPCR expresados según el presente sistema inventivo puede ser útil en la modulación (por ejemplo, tanto el aumento como la disminución) de la unión del GPCR a su ligando análogo y potencialmente para controlar o afectar a las propiedades farmacéuticas u otras propiedades del GPCR expresado.

En general, los profesionales de la presente invención seleccionarán una glucoproteína de interés, y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Las técnicas de la presente invención se han aplicado con éxito tanto a glucoproteínas unidas por O (Ejemplos 1 y 2) como por N (Ejemplos 3 y 4), lo que indica que la presente invención será útil para la expresión general de glucoproteínas. Cualquier glucoproteína dada que vaya a ser expresada según la presente invención puede tener sus propias características particulares y puede afectar a la densidad o la viabilidad celular de las células cultivadas, puede ser expresada a unos niveles menores que otra glucoproteína producida en unas condiciones de cultivo idénticas, y puede ser glucosilada diferentemente en uno o más sitios dependiendo de las condiciones exactas de cultivo y de las etapas realizadas. El experto habitual en la técnica será capaz de modificar apropiadamente las etapas y las composiciones usadas para producir una glucoproteína en particular según las enseñanzas de la presente invención con objeto de optimizar el crecimiento celular y la producción y/o el patrón de glucosilación de cualquier glucoproteína expresada dada.

En ciertas formas de realización, los inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNFR-1; documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014, publicado el 20 de marzo de 1991) son expresados según los sistemas y los procedimientos

de la presente invención (para una recapitulación, véase, Naismith y Sprang, J Inflamm. 47 (1 - 2): 1 - 7, 1995 - 96, incorporado a este documento como referencia en su totalidad). Según algunas formas de realización, un inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un receptor soluble del TNF. En ciertas formas de realización, un inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un TNFR-Ig soluble. En ciertas formas de realización, los inhibidores del TNF de la presente invención son formas solubles del TNFRI y del TNFRII. En ciertas formas de realización, los inhibidores del TNF de la presente invención son proteínas de unión solubles del TNF. En ciertas formas de realización, los inhibidores del TNF de la presente invención son proteínas de fusión de TNFR-Ig, por ejemplo, TNFR-Fc o *etanorcept*. Según se usa en este documento, "*etanorcept*," se refiere a TNFR-Fc, que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor p75 del TNF- α , consistiendo cada molécula en una porción de Fc de 235 aminoácidos de la IgG1 humana.

Introducción de genes para la expresión de glucoproteínas en células hospedadoras

Generalmente, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la glucoproteína deseada que va a ser expresada según la presente invención. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto génico que induzca la expresión de la glucoproteína deseada por parte de la célula. Por ejemplo, el material genético introducido puede codificar un factor de transcripción que active la transcripción de una glucoproteína endógena o heteróloga. Alternativamente o adicionalmente, una molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o la estabilidad de una glucoproteína expresada por la célula.

Son conocidos en la técnica procedimientos adecuados para la introducción de unos ácidos nucleicos suficientes para conseguir la expresión de una glucoproteína de interés en células hospedadoras de mamífero. Véanse, por ejemplo, Geting y col., Nature, 293: 620 - 625, 1981; Mantei y col., Nature, 281: 40 - 46, 1979; Levinson y col., documento EP 117.060; y documento EP 117.058. Para las células de mamífero, los procedimientos habituales de introducción de material genético en células de mamífero incluyen el método de precipitación con fosfato cálcico Graham y van der Erb (Virology, 52: 456 - 457, 1978) o el Método de la lipofectamina™ (Gibco BRL) de Hawley-Nelson (Focus 15: 73, 1993). Los aspectos generales de las transformaciones en sistemas hospedadores de células de mamífero han sido descritos por Axel en la Patente de EE.UU. Nº 4.399.216 concedida el 16 de agosto de 1983. Para las diversas técnicas de introducción de material genético en células de mamífero, véanse, Keown y col., Methods in Enzymology, 1989, Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527 - 537, 1990, y Mansour y col., Nature, 336: 348 - 352, 1988.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico que va a ser introducido está en forma de una molécula de ácido nucleico desnuda. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida en una célula puede estar formada únicamente por el ácido nucleico que codifica la glucoproteína y los elementos de control genético necesarios. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica la glucoproteína (incluyendo los elementos reguladores necesarios) puede estar contenido en un vector plasmídico. Algunos ejemplos representativos no limitantes de vectores adecuados para la expresión de glucoproteínas en células de mamífero incluyen pCADN1; pCD, véanse, Okayama, y col. Mol. Cell Biol. 5: 1136 - 1142, 1985; pMClneo Poly-A, véase, Thomas, y col. Cell 51: 503 - 512, 1987; un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610; CDM8, véase, Seed, B. Nature 329: 840, 1987; y pMT2PC, véase Kaufman, y col. EMBO J. 6: 187 - 195, 1987. En algunas formas de realización, una molécula de ácido nucleico que va a ser introducida en una célula está contenida en un vector vírico. Por ejemplo, puede insertarse un ácido nucleico que codifica la glucoproteína en el genoma vírico (o en un genoma vírico parcial). Los elementos reguladores que dirigen la expresión de la glucoproteína pueden incluirse con el ácido nucleico insertado en el genoma vírico (es decir, unidos al gen insertado en el genoma vírico) o pueden ser proporcionados por el propio genoma vírico.

Puede introducirse también ADN desnudo en las células mediante la formación de un precipitado que contenga el ADN y fosfato cálcico. Alternativamente, el ADN desnudo también puede introducirse en las células mediante la formación de una mezcla del ADN y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células o mediante la incubación de las células y el ADN conjuntamente en un tampón apropiado y sometiendo las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (por ejemplo, mediante electroporación). Un procedimiento adicional para la introducción de ADN desnudo en células es mezclar el ADN con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo de ADN/liposomas se incuba entonces con las células. El ADN desnudo también puede inyectarse directamente en las células mediante, por ejemplo, microinyección.

Alternativamente, el ADN desnudo también puede introducirse en células complejando el ADN con un catión, tal como polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de la superficie celular (véanse, por ejemplo Wu, G. y Wu, C. H., J. Biol. Chem. 263: 14621, 1988; Wilson y col. J. Biol. Chem. 267: 963 - 967, 1992; y la Patente de EE.UU. Nº 5.166.320). La unión del complejo de ADN-ligando al receptor facilita la captación del ADN mediante una endocitosis mediada por receptor.

El uso de vectores víricos que contienen secuencias de ácidos nucleicos en particular, por ejemplo, un ADNc que codifica para una glucoproteína, es una metodología habitual para la introducción de secuencias de ácidos nucleicos en una célula. La elección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una gran proporción de células reciben el ácido nucleico, lo que puede obviar la necesidad de seleccionar las células que han recibido el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector vírico, por ejemplo, por un ADNc contenido en

el vector vírico, se expresan generalmente eficazmente en las células que han captado el ácido nucleico del vector vírico.

5 Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica para fines de terapia génica (para una recapitulación véase, Miller, A. D. *Blood* 76: 271, 1990). Puede construirse un retrovirus recombinante con un ácido nucleico que codifica para una glucoproteína de interés insertado en el genoma del retrovirus. Adicionalmente, pueden eliminarse porciones del genoma del retrovirus para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa. Dicho retrovirus de replicación defectuosa se empaqueta entonces en viriones que pueden ser usados para infectar una célula objetivo mediante el uso de un virus colaborador mediante técnicas convencionales.

10 El genoma de un adenovirus puede ser manipulado para que codifique y exprese una glucoproteína de interés pero que esté inactivado en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida vírico lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner y col., *BioTechniques* 6: 616, 1988; Rosenfeld y col., *Science* 252: 431 - 434, 1991; y Rosenfeld y col., *Cell* 68: 143 - 155, 1992. Los vectores adenovíricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad de tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son conocidos por los expertos en la técnica.

15 Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no requieren la división de células para ser eficaces vehículos de suministro de genes y pueden ser usados para infectar una gran diversidad de tipos celulares, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld y col., 1992, mencionada anteriormente), células endoteliales (Lemarchand y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 6482 - 6486, 1992), hepatocitos (Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 2812 - 2816, 1993) y células musculares (Quantin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 2581 - 2584, 1992). Adicionalmente, el ADN adenovírico introducido (y el ADN foráneo contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula hospedadora sino que permanece episomal, evitando así los potenciales problemas que pueden producirse como resultado de mutagénesis por inserciones en situaciones en las que el ADN introducido queda integrado en el genoma del hospedador (por ejemplo, ADN retrovítico). Además, la capacidad portadora de ADN foráneo del genoma adenovírico es grande (de hasta 8 kilobases) con respecto a la de otros vectores de administración de genes (Berkner y col., mencionado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.* 57: 267, 1986). La mayoría de los vectores adenovíricos de replicación defectuosa usados actualmente tienen deletados todos o parte de los genes víricos E1 y E3 pero conservan tanto como el 80% del material genético adenovírico.

30 El virus adeno-asociado (AAV) es un virus defectuoso natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, como virus colaborador para la replicación eficaz y un ciclo de vida productivo. (Para una recapitulación véase, Muzyczka y col. *Curr. Topics in Micro. and Immunol.*, 158: 97 - 129, 1992). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen, y muestra una elevada frecuencia de integración estable (véanse, por ejemplo Flotte y col., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 7: 349 - 356, 1992; Samulski y col., *J. Virol.*, 63: 3822 - 3828, 1989; y McLaughlin y col., *J. Virol.*, 62: 1963 - 1973, 1989). Los vectores que contienen tan pocos como 300 pares de bases de AAV pueden ser empaquetados e integrados. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin y col. (*Mol. Cell. Biol.* 5: 3251 - 3260, 1985) puede usarse para introducir ADN en células. Se han introducido varios ácidos nucleicos en diferentes tipos celulares usando vectores de AAV (véanse, por ejemplo Hermonat y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6466 - 6470, 1984; Tratschin y col., *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072 - 2081, 1985; Wondisford y col., *Mol. Endocrinol.*, 2: 32 - 39, 1988; Tratschin y col., *J. Virol.*, 51: 611 - 619, 1984; y Flotte y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 3781 - 3790, 1993).

45 Cuando el procedimiento usado para introducir moléculas de ácidos nucleicos en una población de células da como resultado una modificación en una gran proporción de las células y una expresión eficaz de la glucoproteína por parte de las células, la población de células modificada puede usarse sin un aislamiento o subclonación adicionales en la población. Esto es, puede haber una producción suficiente de la glucoproteína por parte de la población de células como para que no se necesite un aislamiento celular adicional, y la población pueda usarse inmediatamente para la siembra de un cultivo celular para la producción de la glucoproteína. Alternativamente, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células a partir de unas pocas células o de una única célula que produzca eficazmente la glucoproteína.

50 Alternativamente a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula que codifica una glucoproteína de interés, el ácido nucleico a introducir puede codificar otro polipéptido o proteína que induzca o aumente el nivel de expresión de la glucoproteína producida endógenamente por una célula. Por ejemplo, una célula puede ser capaz de expresar una glucoproteína en particular pero puede fracasar al hacerlo sin un tratamiento adicional de la célula. De forma análoga, la célula puede expresar una cantidad insuficiente de la glucoproteína para el fin deseado. Por lo tanto, puede usarse un agente que estimule la expresión de la glucoproteína de interés para inducir o aumentar la expresión de esa glucoproteína por parte de la célula. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida puede codificar para un factor de transcripción que active o regule por aumento la transcripción de la glucoproteína de interés. La expresión de dicho factor de transcripción conduce, a su vez, a la expresión o a una expresión más fuerte de la glucoproteína de interés.

60 En ciertas formas de realización, se introduce de forma estable un ácido nucleico que dirige la expresión de la glucoproteína en la célula hospedadora. En ciertas formas de realización, se introduce de forma transitoria un ácido

nucleico que dirige la expresión de la glucoproteína en la célula hospedadora. El experto habitual en la técnica será capaz de elegir si introduce de forma estable o transitoria un ácido nucleico en la célula basándose en sus necesidades experimentales.

5 Opcionalmente puede unirse un gen que codifica una glucoproteína de interés con uno o más elementos reguladores de control genético. En ciertas formas de realización, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la glucoproteína. En ciertas formas de realización, puede usarse un elemento de control genético que proporcione una expresión inducible de un gen que codifique la glucoproteína de interés. El uso de un elemento de control genético inducible (por ejemplo, un promotor inducible) permite modular la producción de la glucoproteína en la célula. Algunos ejemplos no limitantes de elementos de control genético inducibles potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen elementos reguladores de hormonas (por ejemplo, véase, Mader, S. y White, J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 5603 - 5607, 1993), elementos regulados por ligandos sintéticos (véase, por ejemplo Spencer, D. M. y col., Science, 262: 1019 - 1024, 1993) y elementos reguladores por radiación ionizante (por ejemplo, véanse, Manome, Y. y col., Biochemistry, 32: 10607 - 10613, 1993; Datta, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89: 10149 - 10153, 1992). Según la invención pueden usarse otros sistemas reguladores específicos celulares adicionales.

El experto habitual en la técnica será capaz de elegir y, opcionalmente, modificar apropiadamente el procedimiento de introducción de genes que provoquen que la célula exprese la glucoproteína de interés según las enseñanzas de la presente invención.

Células

20 Puede utilizarse cualquier célula hospedadora susceptible de cultivo celular y de expresar las glucoproteínas según la presente invención. En ciertas formas de realización, una célula hospedadora es de mamífero. Algunos ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse según la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC N° 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Holanda)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humana (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216, 1980); células de sertoli (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243 - 251, 1980); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W 138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N. Y. Acad. Sci., 383: 44 - 68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

35 Adicionalmente, puede utilizarse cualquier cantidad de líneas celulares de hibridoma disponibles y no disponibles comercialmente que expresen glucoproteínas según la presente invención. El experto en la técnica apreciará que las líneas celulares de hibridoma podrían tener unos requisitos nutricionales diferentes y/o requerir unas condiciones de cultivo diferentes para un crecimiento y una expresión de la glucoproteína óptimos, y serán capaces de modificar estas condiciones según sea necesario.

40 Como se mencionó anteriormente, en muchos casos las células pueden seleccionarse o modificarse para que produzcan unos elevados niveles de glucoproteína. A menudo, las células pueden ser manipuladas por la mano del hombre para que produzcan unos elevados niveles de glucoproteína, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifica para la glucoproteína de interés y/o mediante la introducción de elementos de control genético que regulen la expresión de ese gen (tanto si es endógeno como introducido).

45 El experto habitual en la técnica apreciará que las glucoproteínas producidas en diferentes tipos celulares pueden contener diferentes patrones de glucosilación resultantes. Por ejemplo, Przybylo y col. demostraron que los patrones de glucosilación de las cadherinas diferían cuando eran expresadas en células epiteliales de uréter no malignas, en células HCV29 transfectadas con v-raf y en cánceres celulares transicionales de la vejiga urinaria (véase, Przybylo y col., Cancer Cell International, 2 (1): 6, 2002). Lifely y col. demostraron que el patrón de glucosilación y la actividad biológica de un anticuerpo IgG humanizado diferían cuando era expresado en CHO, en líneas celulares YO y de mieloma NSO (véase, Lifely y col., Glycobiology, 5 (8): 813 - 22, 1995). El experto habitual en la técnica será capaz de seleccionar una línea celular deseable para la producción de una glucoproteína en particular sin una experimentación excesiva. Independientemente de la línea celular finalmente seleccionada, puede expresarse una glucoproteína según la presente invención, dando como resultado un patrón de glucosilación más amplio.

55 Ciertas glucoproteínas pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o algunas otras características de las células, que limiten finalmente la producción de la glucoproteína de interés de alguna forma. Incluso entre una población de células de un tipo en particular diseñadas para que expresen una glucoproteína específica, existe una variabilidad dentro de la población celular tal que algunas células individuales se cultivarán mejor, producirán más glucoproteína de interés, producirán una glucoproteína con un patrón de glucosilación más amplio o producirán una glucoproteína cuyo patrón de glucosilación refleje de forma más precisa

el patrón de glucosilación de la glucoproteína natural. En ciertas formas de realización, el profesional selecciona típicamente una línea celular para un crecimiento robusto en unas condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En algunas formas de realización, las células individuales diseñadas para que expresen una glucoproteína en particular se eligen para una producción a gran escala basándose en el crecimiento celular, en la densidad celular final, en el porcentaje de viabilidad celular, en el título de la glucoproteína expresada, en el grado y la composición de las cadenas laterales de oligosacáridos o cualquier combinación de estos o cualquier otras condiciones consideradas importantes por el profesional.

Cultivo de las células

La presente invención puede usarse con cualquier procedimiento de cultivo celular que sea susceptible de expresar glucoproteínas. Por ejemplo, pueden cultivarse células en cultivos por lotes o semicontinuos en los que el cultivo finaliza tras una expresión suficiente de la glucoproteína, tras lo cual se recoge la glucoproteína expresada. Alternativamente, las células pueden cultivarse en cultivos por perfusión, en los que el cultivo no finaliza y se añaden periódica o continuamente nuevos nutrientes y otros componentes al cultivo, durante lo que la glucoproteína expresada se recoge periódica o continuamente.

Las células pueden cultivarse en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en recipientes de reacción a pequeña escala en un volumen de entre unos pocos mililitros hasta varios litros. Alternativamente, las células pueden cultivarse en biorreactores comerciales a gran escala con un volumen que varía entre aproximadamente al menos 1 litro hasta 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los mismos.

La temperatura de un cultivo celular se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas a las que el cultivo celular permanece viable, intervalo en el que se produce un elevado nivel de glucoproteína y/o intervalo en el que la glucoproteína expresada contiene un patrón de glucosilación deseable. Por ejemplo, las células CHO crecen bien y pueden producir glucoproteínas con unos patrones de glucosilación deseables a unos niveles comercialmente adecuados a aproximadamente a 37°C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien y pueden producir glucoproteínas con unos patrones de glucosilación deseables a unos niveles comercialmente adecuados en un intervalo de aproximadamente 25°C hasta 42°C, aunque los procedimientos enseñados por la presente desvelación no están limitados a estas temperaturas. Ciertas células de mamífero crecen bien y pueden producir glucoproteínas con unos patrones de glucosilación deseables a unos niveles comercialmente adecuados en el intervalo de aproximadamente 35°C hasta 40°C. En ciertas formas de realización, se cultiva un cultivo celular a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45°C en uno o más momentos durante el proceso de cultivo celular. Los expertos habituales en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas a las que cultivar las células, dependiendo de las necesidades particulares de las células y de los requisitos de producción en particular del profesional.

Adicionalmente, un cultivo puede someterse a uno o más cambios de temperatura durante el transcurso del cultivo. Cuando se cambia la temperatura de un cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, se puede tardar varias horas o días para completar el cambio de temperatura. Alternativamente, el cambio de temperatura puede ser relativamente brusco. La temperatura puede incrementarse o disminuirse gradualmente durante el proceso de cultivo. Alternativamente, la temperatura puede incrementarse o disminuirse en cantidades pequeñas en diversos momentos durante el proceso de cultivo. La(s) subsiguiente(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura(s) puede(n) ser menor(es) o mayor(es) que la(s) temperatura(s) o el (los) intervalo(s) de temperatura(s) inicial(es) o previo(s). El experto habitual en la técnica comprenderá que esta forma de realización engloba múltiples cambios pequeños de temperatura. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse una vez (hacia una temperatura o intervalo de temperatura mayor o menor), mantener las células a esta temperatura o intervalo de temperatura durante un cierto periodo de tiempo tras lo cual la temperatura puede cambiarse de nuevo hasta una nueva temperatura o intervalo de temperatura, que puede ser mayor o menor que la temperatura o el intervalo de temperatura de la temperatura o del intervalo de temperatura. La temperatura del cultivo después de cada pequeño cambio puede ser constante o puede mantenerse en un cierto intervalo de temperaturas.

Al igual que con la temperatura o el intervalo de temperatura, la temperatura o el intervalo de temperatura de un cultivo celular después del (los) cambio(s) de temperatura se selecciona generalmente basándose principalmente en la(s) temperatura(s) a la(s) que el cultivo celular permanece viable, intervalo en el que se produce un elevado nivel de glucoproteína y/o intervalo en el que la glucoproteína expresada contiene un patrón de glucosilación deseable. En general, la mayoría de las células de mamífero permanecen viables y expresan glucoproteínas con unos patrones de glucosilación deseables a unos niveles comercialmente adecuados en un intervalo de aproximadamente 25°C hasta 42°C, aunque los procedimientos enseñados por la presente desvelación no están limitados a estas temperaturas. En ciertas formas de realización, las células de mamífero permanecen viables y expresan glucoproteínas con unos patrones de glucosilación deseables a unos niveles comercialmente adecuados en un intervalo de aproximadamente 25°C hasta 35°C. Los expertos habituales en la técnica serán capaces de seleccionar la(s) temperatura(s) o el (los) intervalo(s) de temperatura(s) adecuado(s) en el (los) que cultivar las células, dependiendo de las necesidades particulares de las células y de los requisitos de producción en particular del profesional. Las células pueden cultivarse durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del profesional y de los requisitos de las propias células.

En ciertas formas de realización, las reacciones por lotes y las semicontinuas finalizan una vez que la glucoproteína expresada alcanza un título lo suficientemente alto y/o una vez que la glucoproteína expresada muestra un patrón de glucosilación deseable, según determinen las necesidades del profesional. Adicionalmente o alternativamente, las reacciones por lotes y semicontinuas pueden finalizar una vez que las células alcancen una densidad lo suficientemente alta, según determinen las necesidades del profesional. Por ejemplo, el cultivo puede finalizar una vez que las células alcanzan un porcentaje del 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 99 de la densidad celular viable máxima. Adicionalmente o alternativamente, las reacciones por lotes y semicontinuas pueden finalizar antes de una excesiva acumulación de productos de desecho metabólicos tales como lactato y amonio.

En ciertos casos puede ser beneficioso complementar un cultivo celular durante la subsiguiente fase de producción con nutrientes u otros componentes del medio que hayan sido agotados o metabolizados por las células. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso complementar un cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones inorgánicos (tales como, por ejemplo, sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a unas concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía. Dichos componentes complementarios pueden añadirse al cultivo celular todos al mismo tiempo, o pueden ser aportados al cultivo celular en una serie de adiciones.

El experto habitual en la técnica será capaz de ajustar las condiciones específicas del cultivo celular con objeto de optimizar ciertas características del cultivo celular que incluyen, pero no se limitan a, la tasa de crecimiento, la viabilidad celular, la densidad celular final del cultivo celular, la concentración final de los subproductos metabólicos perjudiciales tales como lactato y amonio, el título final de la glucoproteína expresada, el grado y la composición de las cadenas laterales de oligosacáridos o cualquier combinación de estas u otras condiciones consideradas importantes por el profesional.

Aislamiento de la glucoproteína expresada

En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar las glucoproteínas expresadas según la presente invención. En ciertas formas de realización, la glucoproteína expresada es secretada en el medio y por lo tanto pueden extraerse las células y otros sólidos, como mediante centrifugación o filtración, por ejemplo, como una primera etapa en el proceso de purificación. Alternativamente, la glucoproteína expresada puede unirse a la superficie de la célula hospedadora. Por ejemplo, puede extraerse el medio, y las células hospedadoras que expresan la glucoproteína se lisan en una primera etapa del proceso de purificación. La lisis de células hospedadoras de mamífero puede conseguirse mediante cualquiera de los medios bien conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo una desestabilización física con microesferas de vidrio y la exposición a unas condiciones de pH elevado.

La glucoproteína expresada puede aislarse y purificarse mediante procedimientos estándar que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de exclusión por tamaños y de hidroxipatito), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, precipitación en etanol y/o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véanse, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2ª Edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S. J. y Hames, B. D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol. 182), Academic Press, 1997. Para la cromatografía de inmunoafinidad en particular, la glucoproteína puede aislarse uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que fueron creados contra esa glucoproteína y que fueron fijados sobre un soporte estacionario. Alternativamente, pueden unirse marcas de afinidad tales como una secuencia de la envoltura de gripe, poli-histidina o glutatión-S-transferasa a la glucoproteína mediante técnicas recombinantes estándar para permitir una fácil purificación mediante el paso a través de la columna de afinidad apropiada. Pueden añadirse inhibidores de la proteasa tales como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina en cualquiera o en todas las etapas con objeto de reducir o eliminar la degradación de la glucoproteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de la proteasa son particularmente ventajosos cuando las células deben ser lisadas con objeto de aislar y purificar la glucoproteína expresada. Adicionalmente o alternativamente, pueden añadirse inhibidores de la glucosidasa en cualquiera o en todas las etapas con objeto de reducir o eliminar el corte enzimático de las cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente.

Las glucoproteínas expresadas según la presente invención pueden tener unos patrones de glucosilación más amplios o modificados de otro modo con respecto a los que tendrían si hubieran crecido en unas condiciones de cultivo celular tradicionales. Por lo tanto, un beneficio práctico de la presente invención que puede ser explotado en la etapa de purificación es que los residuos de azúcar adicionales y/o de una glucoproteína cultivada según algunos de los presentes procedimientos inventivos pueden conferir distintas propiedades bioquímicas a la misma que pueden ser usadas por el profesional para purificar más fácilmente esa glucoproteína, o hasta una pureza mayor, de lo que sería posible para una glucoproteína cultivada según otros procedimientos más tradicionales.

El experto habitual en la técnica apreciará que la técnica de purificación exacta variará dependiendo del carácter de la glucoproteína que se va a purificar, del carácter de las células en la que es expresada la glucoproteína y/o de la

composición del medio en el que han crecido las células.

Composiciones inmunógenas

Las glucoproteínas producidas según las enseñanzas de la presente desvelación también pueden usarse en composiciones inmunógenas, por ejemplo, como vacunas. En ciertas formas de realización, un patrón de glucosilación mejorado conseguido mediante la producción de glucoproteínas según ciertos procedimientos de la presente invención puede dar como resultado una composición inmunógena más eficaz. Por ejemplo, la composición inmunógena que contiene la glucoproteína producida puede desencadenar una respuesta inmunitaria más eficaz en la que el sistema inmunitario del sujeto produce un mayor número de anticuerpos contra la glucoproteína y/o produce unos anticuerpos que muestran una mayor especificidad para la glucoproteína inmunógena. Adicionalmente o alternativamente, dicha glucoproteína puede desencadenar una respuesta humanitaria con menos efectos secundarios y/o menos graves. En ciertas formas de realización, las composiciones inmunógenas de la invención comprenden una o más glucoproteínas. Adicionalmente o alternativamente, una composición inmunógena inventiva puede incluir uno o más vehículos fisiológicamente aceptables.

En general, la selección de la "cantidad eficaz" apropiada o las dosis de los componentes de una(s) composición(es) inmunógena(s) inventiva(s) se basan en diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, la identidad de la(s) glucoproteína(s) seleccionada(s) en la composición inmunógena empleada, el patrón de glucosilación de la(s) glucoproteína(s) y el estado físico del sujeto, muy especialmente incluyendo la salud general, la edad y/o el peso del sujeto inmunizado. Como se sabe en la técnica, los procedimientos y las vías de administración en particular y la presencia de componentes adicionales en las composiciones inmunógenas también pueden afectar a las dosis y a las cantidades de las composiciones de plásmidos de ADN. Dicha selección y ajuste hacia arriba o hacia abajo de la dosis eficaz está en la pericia de la técnica. La cantidad de composición inmunógena requerida para inducir una respuesta inmunitaria, incluyendo, pero no limitándose a, una respuesta protectora, o producir un efecto exógeno en el paciente sin los efectos secundarios indeseables significativos, varía dependiendo de estos factores. Las dosis adecuadas las determinarán fácilmente las personas expertas en la técnica.

Ciertas composiciones inmunógenas de la presente invención pueden contener un coadyuvante. Un coadyuvante es una sustancia que mejora la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o un antígeno. Se ha demostrado que una serie de citocinas o linfocinas tienen una actividad inmunitaria moduladora, y por lo tanto pueden usarse como coadyuvantes, incluyendo, pero no limitándose a, las interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones α , β y γ , el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.078.996), el factor estimulante de las colonias de macrófagos, el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el GSF y los factores de necrosis tumoral α y β . Otros coadyuvantes más usados en esta invención incluyen una quimiocina, incluyendo, sin limitación, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. Las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina, también pueden ser útiles como coadyuvantes. Otros coadyuvantes útiles más incluyen, sin limitación, una molécula mucinoide, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAMs, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas coestimulantes tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1, y el factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras que incluyen Fas, el receptor del TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Otra molécula coadyuvante más incluye la caspasa (ICE). Véanse también las Publicaciones de Patente Internacionales N° WO98/17799 y WO99/43839.

También útiles como coadyuvantes son las toxinas coléricas (CT) y los mutantes de las mismas, incluyendo los descritos en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 00/18434 (en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 es sustituido por otro aminoácido (distinto al ácido aspártico), preferiblemente una histidina). Similares CT o mutantes se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098368 (en la que la isoleucina en la posición del aminoácido 16 es sustituida por otro aminoácido, ya sea solo o junto con la sustitución de la serina en la posición del aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en la que la valina en la posición del aminoácido 72 es sustituida por otro aminoácido). Otras toxinas CT se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098369 (en la que la arginina en la posición del aminoácido 25 es sustituida por otro aminoácido; y/o se inserta un aminoácido en la posición del aminoácido 49; y/o se insertan dos aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 35 y 36).

En ciertas formas de realización, las composiciones inmunógenas de la presente invención son administradas a un ser humano o a un vertebrado no humano mediante diversas vías que incluyen, pero no se limitan a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 98/20734), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La vía apropiada puede seleccionarse dependiendo de la naturaleza de la composición inmunógena usada, una evaluación de la edad, el peso, el sexo y el estado general del paciente y los antígenos presentes en la composición inmunógena, y/u otros factores conocidos por los expertos habituales en la técnica.

En ciertas formas de realización, las composiciones inmunógenas son administradas varias veces. El orden de administración de la composición inmunógena y los periodos de tiempo entre las administraciones individuales pueden ser seleccionados por el experto en la técnica basándose en factores conexos conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, las características físicas y las respuestas precisas del hospedador a la aplicación del procedimiento.

Formulaciones farmacéuticas

En ciertas formas de realización, las glucoproteínas producidas tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones inventivas según se ha descrito anteriormente pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse en primer lugar para su administración mediante cualquier vía disponible que incluye, pero no se limita a, las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente una glucoproteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero, un agente de administración (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, un tensoactivo, etc., según se ha descrito anteriormente) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según se usa en este documento, el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. Por ejemplo, una glucoproteína producida según la presente invención puede conjugarse adicionalmente con otros fármacos para una farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica y radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz y col., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, documento US20040082764 A1).

Alternativamente o adicionalmente, una proteína o un polipéptido producido según la presente invención puede ser administrado junto con (tanto simultáneamente como secuencialmente) uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Una lista ejemplar de estos agentes farmacéuticamente activos puede encontrarse en Physicians' Desk Reference, 55ª Edición, publicado por Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, 2001, incorporado en este documento como referencia. Para muchos de estos agentes enumerados, las dosis y los regímenes farmacéuticamente eficaces son conocidos en la técnica; muchos están incluidos en el propio Physicians' Desk Reference.

Una composición farmacéutica se fórmula ventajosamente para que sea compatible con su vía de administración prevista. Las disoluciones o las suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o glucosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede envasarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen típicamente disoluciones (cuando son solubles en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, algunos vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debería ser estéril y debería ser fluida hasta el punto de que pueda manipularse y aplicarse bien con jeringa. Ciertas formulaciones farmacéuticas de la presente invención son estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y deben ser preservadas de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, un vehículo pertinente puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos será ventajoso que se incluyan agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando la glucoproteína purificada en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de la glucoproteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación incluyen, por ejemplo, secado a vacío y liofilización, que produce un polvo del

principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el fin de la administración terapéutica oral, la glucoproteína purificada puede ser incorporada con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un vehículo fluido para su uso como un colutorio. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales coadyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, las pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato magnético o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Las formulaciones para su administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad en el tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para su administración mediante inhalación, las composiciones inventivas que comprenden una glucoproteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero y un agente de suministro se suministran ventajosamente en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado o un dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. La presente invención contempla particularmente la administración de las composiciones mediante el uso de un pulverizador nasal, un inhalador u otra administración directa en las vías respiratorias superiores y/o inferiores. La administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra el virus de la gripe ha demostrado inducir respuestas de los linfocitos T CD8, lo que indica que al menos algunas células del tracto respiratorio pueden captar el ADN cuando es suministrado mediante esta vía, y los agentes de suministro de la invención mejorarán la captación celular. Según ciertas formas de realización, las composiciones que comprenden una glucoproteína purificada expresada a partir de una línea celular de un mamífero y un agente de suministro se formulan como grandes partículas porosas para su administración en aerosol.

La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan los penetrantes apropiados para la barrera que deben atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede realizarse mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, la glucoproteína purificada y los agentes de suministro se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas, como se sabe generalmente en la técnica.

Las composiciones también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para su administración por vía rectal.

En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas inventivas contienen excipientes opcionales tales como un anestésico local, un péptido, un lípido, incluyendo lípidos catiónicos, un liposoma o una partícula lipídica, un polímero tal como polilisina, un polímero tridimensional ramificado tal como un dendrímero, un carbohidrato, un anfililo catiónico, un detergente, un tensioactivo de bencilamonio u otro compuesto que facilite la transferencia del polinucleótido a las células. Dichos agentes de facilitación incluyen los anestésicos locales bupivacaína o tetracaína (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. N° 5.593.972; 5.817.637; 5.380.876; 5.981.505 y 6.383.512 y la Publicación de Patente Internacional N° WO98/17799).

En ciertas formas de realización, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán a la glucoproteína frente a una rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente en Alza Corporation y en Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas suspensiones pueden prepararse según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.522.811.

Puede ser ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en formas farmacéuticas unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Una forma farmacéutica unitaria, según se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente aisladas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se va a tratar, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada de la glucoproteína activa calculada para que produzca el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Una glucoproteína expresada según la presente invención puede ser administrada en diversos intervalos y durante

- diferentes periodos de tiempo según se requiera, por ejemplo, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, entre 2 y 8 semanas, entre aproximadamente 3 y 7 semanas, aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas, etc. El artesano experto apreciará que existen ciertos factores que pueden afectar a la dosificación y a la cronología requeridas para tratar de forma eficaz a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Generalmente, el tratamiento de un sujeto con una glucoproteína según se describe en este documento puede incluir un único tratamiento, o en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Se entenderá que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia de la glucoproteína y opcionalmente pueden ajustarse al receptor en particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta que se consiga una respuesta deseada preseleccionada. Adicionalmente se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal en particular puede depender de diversos factores que incluyen la actividad de la glucoproteína empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el género, la dieta del sujeto, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y/o el grado de expresión o de actividad que se va a modular.
- 15 La presente invención incluye el uso de las composiciones inventivas para el tratamiento de animales no humanos. Consecuentemente, las dosis y los procedimientos de administración pueden seleccionarse según los principios conocidos de la farmacología y medicina veterinarias. Puede encontrarse una guía, por ejemplo, en Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8ª edición, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.
- 20 Las composiciones farmacéuticas inventivas pueden estar incluidas en un recipiente, un envase o un dispensador junto con instrucciones para su administración.
- Debe entenderse que la anterior descripción únicamente es representativa y no pretende ser limitante. Otros procedimientos y materiales alternativos para la implementación de la invención, y también aplicaciones adicionales, serán evidentes para el experto en la técnica, y pretenden estar incluidas en las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: formulaciones del medio**

- La presente invención engloba el hallazgo de que las glucoproteínas producidas mediante el cultivo de células cultivadas en un medio de cultivo que contiene manganeso a una o más de las concentraciones inventivas contienen unos patrones de glucosilación más amplios de lo que tendrían si las células se hubieran cultivado en medios tradicionales. El manganeso puede ser añadido a cualquier medio de cultivo que sea capaz de sostener el crecimiento celular. Algunos medios de cultivo ejemplares a los que puede añadirse manganeso en cualquiera de las concentraciones inventivas se presentan en la Tabla 1, aunque la presente invención no se limita a la utilización de estos medios de cultivo. Como entenderá cualquier experto habitual en la técnica, pueden utilizarse otros medios de cultivo para el cultivo de las células y/o pueden realizarse ciertas modificaciones en las composiciones de los medios de cultivo ejemplares presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo ejemplares

	Medio A		Medio B		Medio C		Medio D		Medio E	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
Aminoácidos										
Alanina	96,03	1,08	24,87	0,28	17,80	0,20			24,87	0,28
Arginina	1186,99	6,82	423,43	2,43	347,97	2,00	84,00	0,40	423,43	2,43
Asparagina H ₂ O	713,59	4,76	173,90	1,16	75,00	0,50			173,90	1,16
Acido aspártico	318,53	2,39	52,72	0,40	26,20	0,20			52,72	0,40
Cisteína HO x H ₂ O	70,01	0,40	70,01	0,40	70,19	0,40	35,10	0,20	70,01	0,40
Cisteína 2 HCl	297,09	0,95	62,09	0,20	62,25	0,20			62,09	0,20
Ácido glutámico					29,40	0,20			41,08	0,28
Glutamato monosódico	158,59	1,08	41,08	0,28						
Glutamina	1892,40	12,96	1162,40	7,96	1163,95	7,97	584,60	4,00	1162	7,96
Glicina	95,88	1,28	35,92	0,48	30,00	0,40	30,00	0,40	35,92	0,48
Histidina HCl x H ₂ O	369,10	1,76	75,27	0,36	46,00	0,22	42,00	0,20	75,27	0,36
Isoleucina	623,63	4,76	151,90	1,16	104,99	0,80	104,80	0,80	151,90	1,16
Leucina	852,31	6,51	172,69	1,32	104,99	0,80	104,80	0,80	172,69	1,32
Lisina HCl	945,96	5,20	218,38	1,20	145,99	0,80	146,20	0,80	218,38	1,20
Metionina	291,82	1,96	53,55	0,36	29,80	0,20	30,00	0,20	53,55	0,36
Fenilalanina	428,62	2,60	98,81	0,60	65,99	0,40	66,00	0,40	98,81	0,60
Prolina	372,25	3,24	96,40	0,84	68,99	0,60			96,40	0,84
Serina	904,71	8,62	273,07	2,60	126,00	1,20			273,07	2,60
Treonina	513,39	4,31	132,81	1,12	94,99	0,80	95,20	0,80	132,81	1,12
Triptófano	159,32	0,78	28,99	0,14	16,00	0,08	16,00	0,08	28,99	0,14
Tirosina 2Na x 2 H ₂ O	560,81	2,15	145,10	0,56	103,79	0,40	89,46	0,40	145,10	0,56
Valina	505,36	4,32	131,17	1,12	93,99	0,80	93,60	0,80	131,17	1,12
Vitaminas										
Biotina	2,00	8,21	0,36	1,49	0,20	0,821			0,36	1,49
Pantotenato cálcico	22,02	46,27	4,03	8,47	2,24	4,71	4,00	8,40	4,03	8,47
Cloruro de colina	87,67	630,74	16,11	115,92	8,99	64,31	4,00	28,60	16,11	115,92
Ácido fólico	25,95	58,84	4,76	10,80	2,65	6,01	4,00	9,10	4,76	10,80
Inositol	123,39	685,47	22,64	125,79	12,60	70,00	7,00	38,90	22,64	125,79

(continuación)

Vitaminas	mg/l	µM										
Nicotinamida	19,60	160,70	3,61	29,62	2,02	16,56	4,00	32,80	3,61	29,62	3,61	29,62
Piridoxal HCl	1,99	9,83	1,99	9,83	2,00	9,89	4,00	19,60	1,99	9,83	1,99	9,83
Piridoxina HCl	18,06	87,67	1,67	8,10	0,03	0,15			1,67	8,10	1,67	8,10
Riboflavina	2,20	5,85	0,40	1,06	0,22	0,58	0,40	1,10	0,40	1,06	0,40	1,06
Tiamina HCl	21,51	63,84	3,92	11,64	2,17	6,44	4,00	11,90	3,92	11,64	3,92	11,64
Vitamina B12	6,93	5,12	1,34	0,99	0,78	0,58			1,34	0,99	1,34	0,99
Sales inorgánicas	mg/l	mM										
CaCl ₂	115,78	1,04	115,78	1,04	116,1	1,046	200,0	1,80	115,78	1,04	115,78	1,04
KCl	310,94	4,17	310,94	4,17	311,8	4,179	400,0	5,40	310,94	4,17	310,94	4,17
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50	70,81	0,50	71,0	0,500			70,81	0,50	70,81	0,50
NaCl	1104,96	18,92	3704,96	63,44	5539,0	94,846	6400,0	110,30	3704	63,44	3704	63,44
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	636,33	4,61	114,53	0,83	62,5	0,453	140,0	0,91	114,33	0,83	114,33	0,83
MgSO ₄	48,70	0,41	48,70	0,41	48,8	0,407			48,70	0,41	48,70	0,41
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	95,00	0,39	8,60	0,03			200,0	0,80	8,60	0,03	8,60	0,03
MgCl ₂	28,53	0,30	28,53	0,30	28,6	0,301			28,53	0,30	28,53	0,30
NaHCO ₃	2000,00	23,81	1220,00	14,52	2440,0	29,044	3700,0	44,00	2440	29,04	2440	29,04
Oligoelementos	µg/l	nM										
Selenito sódico	28,00	161,94	7,00	40,49	0,005	29,0			7,00	40,49	7,00	40,49
Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O	49,86	123,42	49,86	123,42	0,050	124	0,10	250	49,86	123,42	49,86	123,42
CuSO ₄	2,69	16,80	0,97	6,06	0,001	5,0			0,97	6,06	0,97	6,06
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	11,24	45,00	7,49	30,00					7,49	30,00	7,49	30,00
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2503,85	9006,64	1542	5549	0,84	3,021			1542	5549	1542	5549
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2734,77	9528,82	1383	4821	0,430	1498			1383	4821	1383	4821
MnSO ₄ x H ₂ O	0,26	1,51	0,17	1,01					0,17	1,01	0,17	1,01
Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O	210,00	739,27	140	492,84					140,00	492,84	140,00	492,84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	1,86	1,50	1,24	1,00					1,24	1,00	1,24	1,00
NH ₄ VO ₃	0,98	8,33	0,65	5,56					0,65	5,56	0,65	5,56
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,20	0,74	0,13	0,49					0,13	0,49	0,13	0,49
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,18	0,80	0,12	0,53					0,12	0,53	0,12	0,53
Otros componentes	mg/l	µM										
Hidrocortisona	0,23	0,64	0,864	2,4	0,036	0,0001			0,09	0,24	0,09	0,24

(continuación)

Otros componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Otros componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Putrescina x 2 HCl	6,48	40,22	2,48	15,39	1,080	0,0067			2,48	15,39
Acido linoleico	0,22	0,80	0,057	0,20	0,040	0,0001			0,06	0,20
Acido tóctico	0,56	2,73	0,14	0,69	0,100	0,0005			0,14	0,69
D-glucosa (Dextrosa)	16039	89107	11042,24	61350	8950,7	49,7	4500,0	25000	11042	61345
PVA	2560		2520,00		2400,0		2400,0		2520	0,00
Nucelina	54,00		14,00		10,000		10,00		14,00	0,00
Piruvato sódico	54,85	498,63	54,85	500	54,995	500	110,0	1000	54,85	498,63

5 En ciertas formas de realización, las células son complementadas una o más veces tras haber comenzado el cultivo inicial con uno o más medios de alimentación. Algunos ejemplos de medio de alimentación se presentan en la Tabla 2, aunque la presente invención no se limita a la utilización de estos medios de alimentación. Como comprenderá el experto habitual en la técnica, pueden utilizarse otros medios de alimentación para cultivar las células y/o pueden realizarse ciertas modificaciones en las composiciones de los medios de alimentación ejemplares presentados en la Tabla 2. Por ejemplo, las concentraciones de uno o más de los componentes de dichos medios de alimentación pueden aumentarse o disminuirse para conseguir una concentración deseada de dichos componentes. En ciertas formas de realización, la concentración de cada componente del medio de alimentación aumenta o disminuye en el mismo factor. Por ejemplo, la concentración de cada componente del medio de alimentación puede aumentarse o
10 disminuirse en 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x, 15x, 16x, 17x, 18x, 19x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x o más.

Tabla 2. Medios de alimentación ejemplares

	Medio F		Medio G		Medio H		Medio I		Medio J	
	mg/l	mM								
Aminoácidos										
Alanina	17,81	0,20	213,72	2,40	27,47	0,31	142,47	1,60	142,48	1,60
Arginina	191,07	1,10	2292,84	13,20	1074,21	6,17	1528,84	8,79	1528	8,79
Asparagina x H ₂ O	270,05	1,80	3240,60	21,60	3200,00	21,33	1080,60	7,20	1080	7,20
Ácido aspártico	66,66	0,50	799,92	6,00	338,70	2,55	532,40	4,00	532,40	4,00
Cisteína x HCl x H ₂ O	0,00	0,00	0,00	0,00	108,66	0,62			473,00	1,51
Cisteína x 2 HCl	48,83	0,16	585,96	1,92	687,50	2,20	470	1,50	235,38	1,60
Ácido glutámico	29,47	0,20	353,64	2,40			235,38	1,60	142,48	1,60
Glutamato monosódico					52,17	0,31				
Glutamina	456,25	3,13	5475,00	37,56			6000	41,10	4820	33,01
Glicina	15,01	0,20	180,12	2,40	178,26	2,38	120,07	1,60	120,07	1,60
Histidina x HCl x H ₂ O	73,53	0,35	882,36	4,20	732,50	3,49	588,33	2,80	588,32	2,80
Isoleucina	118,05	0,90	1416,60	10,80	880,87	6,72	944,52	7,21	944,52	7,21
Leucina	170,07	1,30	2040,84	15,60	1590,79	12,14	1360,75	10,39	1360	10,39
Lisina x HCl	182,07	1,00	2184,84	12,00	2162,93	11,88	1456,81	8,00	1456	8,00
Metionina	59,62	0,40	715,44	4,80	597,92	4,01	477,06	3,20	477,06	3,20
Fenilalanina	82,53	0,50	990,36	6,00	782,51	4,74	660,36	4,00	660,36	4,00
Prolina	69,03	0,60	828,36	7,20	832,67	7,24	552,31	4,80	552,31	4,80
Serina	158,06	1,51	1896,72	18,12	1623,67	15,46	1264,70	12,04	1264	12,04
Treonina	95,24	0,80	1142,88	9,60	871,72	7,33	762,02	6,40	762,02	6,40
Triptófano	32,61	0,16	391,32	1,92	423,14	2,07	260,94	1,28	260,94	1,28
Lirosina x 2 Na x 2 H ₂ O	104,26	0,40	1251,12	4,80	1100,00	4,21	832,62	3,19	832,62	3,19
Valina	93,64	0,80	1123,68	9,60	1156,01	9,88	749,21	6,40	749,21	6,40
Vitaminas	mg/l	µM								
Biotina	17,81	73,00	4,92	20,16	4,14	16,96	3,28	13,44	3,28	0,01
Pantotenato cálcico	191,07	401,41	54,00	113,52	33,84	71,14	36,02	75,67	36,02	0,08
Cloruro de colina	270,05	1943	214,92	1545	244,57	1759	143,28	1030	143,28	1,03
Ácido fólico	66,66	151,27	63,72	144,60	40,02	90,86	42,43	96,21	42,43	0,10
Inositol			302,52	1680	253,09	1406	201,71	1120,	201,71	1,12

(continuación)

Vitaminas	mg/l	µM										
Nicotinamida	48,83	400,41	48,00	393,60	40,48	331,93	32,018	262,44	32,02			0,26
Piridoxal x HCl	29,47	145,17			3,13	15,42						
Piridoxina x HCl	456,25	2215	49,20	238,92	55,76	207,68	32,82	159,32	32,82			0,16
Riboflavina	15,01	39,92	5,40	14,40	3,73	9,92	3,60	9,57	3,60			0,01
Tiamina x HCl	73,53	218,19	92,88	275,40	100,86	299,28	35,22	104,51	35,22			0,10
Vitamina B12	118,05	87,12	16,80	12,36	32,67	24,11	11,21	8,27	11,21			0,01
Sales inorgánicas	mg/l	mM										
CaCl ₂					179,9	1,62	113,27	1,02				
KCl					482,9	6,47						
KH ₂ PO ₄							1640	12,06	1635			12,02
Na ₂ HPO ₄					87,4	0,62						
NaCl												
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	130,50	0,95	1566,00	11,40	1496,8	10,85						
MgSO ₄					213,0	1,77						
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	21,50	0,09	258,00	1,08			170	0,690	171,98			0,70
MgCl ₂					44,0	0,46						
NaHCO ₃												
Oligoelementos	µg/l	nM										
Selenito sódico	5,00	28,92	60,00	347,04	0,069	0,400	40	231,35	40,00	231,35		
Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O					0,077	0,191						
CuSO ₄	0,43	2,69	5,16	32,28	0,016	0,099	3,44	21,51	3,44			21,51
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,54	6,19	18,48	74,28	0,025	0,100	7,49	30,00	7,49			30,00
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	571,64	2056	6859	24675	7,000	25,180	2534	9115	2534			9115
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	408,08	1421	4896	17062	4,075	14,199	2704	9421	2704			9421
MnSO ₄ x H ₂ O	0,10	0,57	1,20	6,84			0,17	1,01	0,17			1,01
Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O	78,75	277,22	945,00	3326			140	492,84	140			492,84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,70	0,56	8,40	6,72			1,24	1,00	1,24			1,00
NH ₄ VO ₃	0,37	3,13	4,44	37,56			0,65	5,56	0,65			5,56
NI ₂ SO ₄ x 6 H ₂ O	0,07	0,28	0,84	3,36			0,13	0,49	0,13			0,49
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07	0,30	0,84	3,60			0,12	0,53	0,12			0,53

(continuación)

Oligoelementos	µg/l	nM										
AlCl ₃ x 6 H ₂ O							1,2	4,97	1,20	4,97	1,20	4,97
AgNO ₃							0,17	1,00	0,17	1,00	0,17	1,00
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂							2,55	9,98	2,55	9,98	2,55	9,98
KBr							0,12	1,01	0,12	1,01	0,12	1,01
CdCl ₂ x 2,5 H ₂ O							2,28	9,99	2,28	9,99	2,28	9,99
CoCl ₂ x 6 H ₂ O							2,38	10,00	2,38	10,00	2,38	10,00
CrCl ₃							0,32	2,02	0,32	2,02	0,32	2,02
NaF							4,2	100,02	4,20	100,02	4,20	100,02
GeO ₂							0,53	5,07	0,53	5,07	0,53	5,07
KI							0,17	1,02	0,17	1,02	0,17	1,02
RbCl							1,21	10,01	1,21	10,01	1,21	10,01
ZrOCl ₂ x 8 H ₂ O							3,22	9,99	3,22	9,99	3,22	9,99
Otros componentes	mg/l	µM										
Hidro cortisona	0,04	0,10	0,48	1,20	0,288	0,794	0,288	0,794	0,288	0,794	0,288	0,79
Putrescina x 2 HCl	1,00	6,21	12,00	74,52	8	49,66	8	49,66	8	49,66	8	49,66
Acido linoleico	0,04	0,15	0,48	1,80	0,336	1,20	0,336	1,20	0,336	1,20	0,336	1,20
Acido tíctico	0,11	0,51	1,32	6,12	0,841	4,08	0,841	4,08	0,841	4,08	0,841	4,08
D-glucosa (Dextrosa)	4194,14	23300,80	50329	279609	43005	238922	43005	238922	33005	183,37	33005	183,37
PVA	200,00		2400		2400		2400		2400		2400	
Nucelina	10,00		120,00		80		80		80,00		80,00	
Piruvato sódico												

Ejemplo 2: investigación a pequeña escala del cartografiado del péptido rFIX

Introducción: durante la producción de la sustancia farmacológica en bruto ("BDS") del factor coagulante sanguíneo recombinante humano IX ("rFIX"), se observó una diferencia interlotes en el área relativa del pico ("RPAR") del péptido K4 del cartografiado peptídico. Las muestras se prepararon mediante digestión con lisilendopeptidasa de *Achromobacter lyticus* ("AchroK", nº de catálogo de Wako 129-02541), y una subsiguiente resolución mediante HPLC en fase inversa. El RPAR del péptido K4 cayó por debajo del límite inferior del 82% de la muestra de control del material de referencia en ciertos lotes, y alcanzó un mínimo del 78% de la muestra de control. El resto del material se encontró en el pico K4'. La diferencia entre los dos picos se debe íntegramente al grado de glucosilación en la Ser-61. La especie K4 tiene un tetrasacárido de Sia- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O unido a la serina, mientras que la especie K4' que aumentó proporcionalmente sólo tenía fucosa.

Se realizó un experimento de cultivo celular a escala completa durante un periodo en el que se estaban produciendo diferencias en el cartografiado. Las células se cultivaron en un medio de cultivo celular que estaba complementado con FeSO₄ CuSO₄ y cloruro de colina a 2X, 7X y 2X, respectivamente. La BDS producida mediante la purificación a pequeña escala de los lotes experimentales mostró un RPAR del K4 mejorado, pero el material de control purificado de la misma forma no lo hizo. Los lotes de BDS superaron los requisitos de cartografiado peptídico (> 82% de la muestra de control), aunque no alcanzaron el nivel observado en el material de referencia. Esto indicaba que la diferencia observada en los cartografiados de RPAR es el resultado del proceso de cultivo celular y podría estar relacionada con una carencia nutricional.

Análisis de la muestra durante el proceso: las células se retiraron del medio de cultivo celular mediante unas etapas de microfiltración ("MF") y ultrafiltración/diafiltración ("UF/DF"), dando como resultado un material bastante puro procedente de los biorreactores individuales que estaba disponible para su análisis.

Para investigar si la especie K4 estaba siendo retrodegradada o no a la especie K4' (sólo fucosa) después de su secreción desde la célula, se realizó un análisis modificado en una muestra durante el proceso procedente de la fracción retenida de la UF/DF. Una gran muestra de la fracción retenida se dividió en tres alícuotas iguales. Una se purificó inmediatamente en una columna de captura a pequeña escala; está sirvió como control negativo. Las otras dos se incubaron cada una durante una noche a 37°C antes de ser purificadas de una manera similar. A una de las alícuotas incubadas durante una noche se le añadió sialidasa para eliminar el ácido siálico terminal de la especie K4 en caso de que el ácido siálico estuviera bloqueando la actividad de alguna otra glucosidasa. Después de la purificación a pequeña escala, las tres muestras fueron analizadas para evaluar la especie K4 como anteriormente. La Figura 1 muestra que no se produjo degradación en ninguna muestra más allá de la catalizada por la sialidasa. Esto era una indicación muy fuerte de que el problema en el cartografiado peptídico era de origen anabólico, lo que significa que los residuos de azúcar "ausentes" en la Ser-61 nunca fueron añadidos a la cadena emergente. Sin embargo, seguía siendo posible, aunque muy improbable, que la actividad glucosídica responsable de la eliminación de esos residuos de azúcar fuera inactivada o eliminada por las etapas de MF y UF/DF. Los resultados también demuestran la utilidad del sistema de purificación a pequeña escala para el análisis de muestras antes de la etapa de Q Sepharose.

Modelado a pequeña escala: se usaron cultivos a pequeña escala de rFIX cultivado en matraces con agitación como modelo para evaluar los efectos de varios medios y aditivos sobre la especie K4. En cada caso, el medio condicionado de los matraces con agitación se purificó directamente (sin UF/DF) en una columna de captura a pequeña escala usando una recolección de picos basada en el volumen, y se determinó la distribución de K4 en la muestra.

La utilidad del modelo a pequeña escala se demostró mediante el uso de los mismos aditivos que en el experimento a escala completa. También se analizaron las adiciones de manganeso, dado que en una búsqueda bibliográfica se averiguó que el Mn⁺⁺ es necesario para una actividad de glucosilación similar de una enzima de la mosca de la fruta (véanse, Moloney y col., J. Biol. Chem. 275 (13): 9604 - 9611, 2000; Bruckner y col., Nature 406: 411 - 415, 2000). Las comparaciones se realizaron sobre cuatro pases en los matraces en agitación, y los resultados se muestran en la Figura 2. Se muestran inyecciones por duplicado de cada muestra. "P#" indica el número de pases de cada condición. Para P1-2, la concentración de Mn era de 1 nM; para P3-4, era de 10 nM. La diferencia en las distribuciones de las especies de K4 entre el medio de control y el complementado es comparable a la diferencia observada en los biorreactores de producción. Las diferencias se manifiestan tras un único pase, y múltiples pases no revelan ninguna tendencia.

Dado que los aditivos incluían tres componentes (FeSO₄, CuSO₄ y cloruro de colina), el siguiente experimento se dirigió a cuál de estos componentes era el responsable de la mejorada distribución de la especie K4. Los tres componentes se añadieron a los tres cultivos de rFIX en matraces con agitación. Los componentes se añadieron por parejas para revelar cualquier efecto sinérgico. Otros cultivos incluían controles positivos (los tres componentes) y negativos (sin aditivos).

La Figura 3 muestra que el FeSO₄ era el aditivo responsable de ayudar a mejorar la distribución de la especie K4. Se muestran inyecciones por duplicado para cada muestra. Las adiciones se realizaron a las concentraciones experimentales. Parece que la adición de CuSO₄ y de cloruro de colina, en ausencia de FeSO₄, puede hacer que la

distribución sea incluso peor. Debería mencionarse que, por razones desconocidas, la forma des-sialilada de K4' comenzó a aparecer con mayor abundancia tanto en las muestras de prueba como en la referencia de ensayo. Esta tendencia es apreciable en la Figura 3 y continúa en los subsiguientes experimentos.

5 El análisis mediante plasmaespectroscopía acoplada inductivamente ("ICP") del contenido en hierro del polvo del medio demostró que había presente una cantidad apropiada de hierro en el polvo. Esto condujo a la hipótesis de que el beneficio derivado de la adición de FeSO_4 está causado realmente por trazas de un contaminante de ese material de partida. El lote con FeSO_4 que se usó en las condiciones del medio original se analizó mediante un análisis por ICP, y aparecieron trazas de numerosas impurezas a unos niveles superiores a los límites de detección. Mediante la eliminación de los inhibidores y los componentes conocidos del medio de cultivo celular de rFIX, la lista se redujo hasta los siguientes nueve elementos potencialmente beneficiosos: Sb, Bi, B, Co, Ge, Mn, Mo, Ni y V.

10 A continuación se realizaron experimentos de modelado a pequeña escala para explorar algunos otros posibles aditivos que pudieran complementar los aditivos del medio original. Se ensayaron CuSO_4 , ZnSO_4 y MnSO_4 (hasta 10 nM) adicionales. El ZnSO_4 se incluyó porque el cinc puede inhibir competitivamente la captación de otros cationes divalentes. Por razones desconocidas, las condiciones de control y experimentales dieron unas distribuciones muy similares de la especie K4 que eran más parecidas a las observadas previamente para las condiciones de control (véase la Figura 4, se muestran inyecciones por duplicado para cada muestra). Sin embargo, la adición de MnSO_4 a la condición experimental mejoró claramente la distribución de las especies de K4. Parece que la adición de ZnSO_4 puede haber empeorado la distribución de las especies de K4, pero la significación de esta diferencia no está clara. Anteriormente se mencionó que se observó un aumento en el nivel del pico de K4' des-sialilado en la Figura 3. Este fenómeno continuó y aumentó en el transcurso de los estudios a pequeña escala descritos. Esta tendencia no modifica la interpretación de los resultados presentados.

15 **Conclusión:** un amplio ensayo de los eluidos de las columnas de captura durante el proceso y a pequeña escala ha proporcionado una clara evidencia de que una diferencia en el polvo del medio causaba un cambio en el RPAR del K4, que a su vez daba lugar a múltiples diferencias en el cartografiado peptídico. Debido a que la adición de ciertos componentes al medio de cultivo celular revertía parcialmente el cambio, era probable que la diferencia en el polvo del medio sea que uno o más componentes cambiaban a niveles menores. Dado que el aditivo más eficaz descubierto era el FeSO_4 , y el análisis mediante ICP demostró que el polvo del medio contenía la cantidad apropiada de Fe, consecuentemente se hipotetizó que son necesarias trazas de impurezas en el FeSO_4 para una apropiada glucosilación en la Ser-61. Basándose en el análisis mediante ICP del FeSO_4 , las trazas de impurezas no eran un componente en concreto del polvo de medio, sino más bien un nutriente accidental que había estado siempre presente previamente en el medio.

Ejemplo 3: estudios a pequeña escala del impacto de los aditivos del medio sobre el mapa peptídico del rFIX

25 **Introducción:** el Ejemplo 2 demostró que se observaban diferencias interlotes en el grado de glucosilación en la Ser-61 en varios lotes de rFIX, lo que se contempla como un cambio en la distribución de la población del péptido K4. Todos los lotes de rFIX tienen una distribución de las longitudes de la cadena en este sitio dominada por el tetrasacárido completo (Sia- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1), pero algunos lotes tenían una fracción inusualmente alta de la forma de sólo fucosa.

30 El Ejemplo 2 también demostró que el cambio en la distribución de K4 se producía en el biorreactor y estaba estrechamente relacionado con un cambio en el lote de polvo de medio. Los resultados del Ejemplo 2 prestaron un fuerte apoyo a la hipótesis de que el cambio en la distribución de las glucoformas era una función anabólica, y no una catabólica. Adicionalmente, estos experimentos demostraron que el FeSO_4 complementario podría revertir parcialmente el cambio, pero el análisis mediante ICP mostró que no había una diferencia significativa en la concentración de FeSO_4 entre los lotes de polvo de medio. Por lo tanto, se hipotetizó que las trazas de otro componente no identificado del FeSO_4 presentes a niveles variables según los diferentes lotes de polvo de medio, eran los responsables del cambio.

35 **Efectos aditivos:** como se analizó en el Ejemplo 2, el análisis mediante ICP mostró unas cantidades medibles de nueve oligoelementos en el lote de FeSO_4 usado para las condiciones de cultivo experimentales. Una comparación entre estos oligoelementos frente a los publicados en las formulaciones de medio elimina la necesidad de añadir Sb o Bi. Basándonos en las formulaciones de medio y en el análisis mediante ICP del FeSO_4 , se creó una mezcla de cinco compuestos para añadirla a los cultivos de rFIX (concentraciones finales de los medios aportados): 1 nM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10 nM de CoCl_2 , 5,5 nM de NH_4VO_3 , 1,5 nM de NiSO_4 y 20 nM de H_3BO_3 . El MnSO_4 se añadió por separado dado que una recapitulación de la literatura anterior indicó que el manganeso podría ser importante para la actividad de glucosiltransferasa (véanse, Breton y Imberty, Curr. Opin. in Structural Biol. 9: 563 - 571, 1999; Bruckner y col., Nature 406: 411 - 415, 2000). En el mismo experimento se ensayó FeSO_4 (2X o 4X) adicional para determinar si podría aumentar o adicionalmente la cantidad relativa del tetrasacárido. En cada caso, los aditivos se usaron además de los complementos descritos en el Ejemplo 2.

40 Los resultados de este experimento de adición se muestran en la Figura 5. Se determinaron las distribuciones de las especies, y los valores presentados son las proporciones entre las áreas de cada uno de los cuatro picos de K4 y su suma. La figura también muestra los cultivos con material de referencia, de control (sin aditivo) y complementado

(como en el Ejemplo 2). Se muestran inyecciones por duplicado para cada muestra. En cada conjunto de columnas, la columna de la izquierda se corresponde con la fracción de moléculas con un tetrasacárido en la Ser-61, y la columna de la derecha es la fracción con sólo una fucosa. La diferencia observada entre los cultivos de control positivo y negativo (complementado y no complementado, respectivamente) era menor que la que se había observado previamente. Independientemente, la Figura 5 demuestra claramente que la mezcla de oligoelementos no tenía ningún efecto sobre la distribución de especies de K4, mientras que la adición de FeSO₄ y de MnSO₄ mejoraban, ambas, la distribución de especies de K4. Cuando se añadía a los complementos, el MnSO₄ 15 nM tenía aproximadamente el mismo efecto sobre la distribución de especies de K4 que el FeSO₄ 12 mM adicional.

La fuerte respuesta ante el manganeso condujo a experimentos diseñados para encontrar una concentración óptima para el manganeso en el medio de cultivo celular del rFIX. La Figura 6 muestra que este experimento dio unos resultados coherentes con los mostrados en la Figura 5, ya que todos los cultivos con manganeso añadido tenían menos K4 sólo con fucosa de lo que tenían los complementados por los cultivos de control. De hecho, los cultivos con 40 nM o más de manganeso tenían aproximadamente la misma cantidad de K4 sólo con fucosa que el material de referencia del ensayo. Sin embargo, parecía haber más del trisacárido a 100 ó 500 nM que a 40 nM de manganeso. Por lo tanto, se determinó que 40 nM era una concentración de manganeso inesperadamente ventajosa para una glucosilación más amplia del FIX en la Ser-61.

Utilidad del modelo a pequeña escala: una característica inusual de estos experimentos a pequeña escala, y de los presentados en el Ejemplo 2, era el nivel variable del trisacárido, o de la especie des-sialada, entre un experimento y otro. Debido a que esta especie varía de forma similar a la del ensayo de referencia, se cree que es un artefacto del método de digestión en recipiente único. Dado que todas las muestras de un experimento dado fueron digeridas al mismo tiempo usando el mismo material de partida, no se cree que esta variabilidad tenga ningún impacto sobre los análisis presentados en este Ejemplo o en el Ejemplo 2.

Conclusión: estos experimentos demostraron que la adición de MnSO₄ 40 nM al medio de cultivo celular de rFIX mejora la distribución de especies de K4.

Ejemplo 4: análisis del oligosacárido unido por N de muestras de medio de cultivo anti-ABeta

Introducción: se investigaron las huellas moleculares del oligosacárido unido por N de las células CHO que expresan anticuerpo monoclonal humanizado de un péptido anti-ABeta de IgG1 ("células anti-ABeta") en cuatro condiciones de medio. Las identificaciones de muestra y la información pertinente se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestras anti-ABeta recogidas en varias condiciones de cultivo.

ID de muestra	Condición	Gln	Oligoelementos	Vol (ml)	Día	Concentración
1		Alta	No	1	14	3,06 mg/ml
2	Oligoelementos E	Alta	Si	1	14	4,61 mg/ml
3	Poca Gln (4 mM) Oligoelementos E	Baja	Si	1	14	4,44 mg/ml
4	Poca Gln (4 mM), 2 g/l de Glu	Baja	No	1	14	4,14 mg/ml

Procedimiento: el cultivo 1 Anti-ABeta se cultivó y se alimentó periódicamente con medio de alimentación. En el cultivo 2 anti-ABeta se añadieron Oligoelementos E al principio. La Tabla 4 presenta la composición de Oligoelementos E. El cultivo 3 Anti-ABeta se cultivó en unas condiciones idénticas a las del cultivo 2 excepto porque el nivel inicial de glutamina era de 4 mM. El cultivo 4 Anti-ABeta se cultivó en unas condiciones idénticas a las del cultivo 3 excepto porque no se añadieron Oligoelementos E y el medio de alimentación se complementó con glutamato hasta 2 g/l.

Las distribuciones de glucoformas de cada muestra se determinaron mediante una digestión con PNGasa F, seguido de un análisis mediante una cromatografía de intercambio aniónico a elevado pH con detección electroquímica pulsada (HPAEC-PED). Resumidamente, las muestras se intercambiaron con tampón en formiato amónico 50 mM, se tamponaron a pH 7,3 mediante el uso de unos concentradores proteicos Amicon Ultra 30.000 MWCO. Después de la recuperación, cada muestra fue digerida con 5 µl de PNGasa F (sin glicerol) e incubada durante una noche a 37°C. Después, las muestras se secaron mediante una rápida centrifugación a vacío y se reconstituyeron en agua purificada. Después, las muestras se transfirieron a viales de automuestreo para un análisis mediante HPAEC-PED. El sistema de HPAEC-PED está equipado con un protector Dionex CarboPac PA100 y una columna analítica (2 x 250 mm), y un detector ED-40. Se usó un gradiente lineal de acetato sódico que incluye dos eluyentes: eluyente A constituido por NaOH 100 mM y eluyente B constituido por NaOH 100 mM / acetato sódico 500 mM.

Tabla 4. Composición de Oligoelementos E.

Oligoelementos E	µg/l	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O	123,60	100,00
AlCl ₃ • 6 H ₂ O	0,48	2,00
H ₃ BO ₃	6,18	100,00
CrCl ₃	7,92	50,00
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	49,94	200,00
GeO ₂	0,21	2,00
KBr	0,24	2,00
KI	16,60	100,00
LiCl	0,08	2,00
MnSO ₄ • H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	142,03	500,00
NaF	0,08	2,00
NH ₄ VO ₃	1,17	10,00
NiSO ₄ • 6 H ₂ O	2,63	10,00
RbCl	0,24	2,00
SnCl ₂ • 2 H ₂ O	0,45	2,00
Selenito sódico	34,58	200,00

5 **Análisis de los datos:** los tres tipos de glucanos complejos biantenarios unidos por N que se asociaron con el anticuerpo anti-ABeta contenían cero ("G0"), uno ("G1") o dos (G2") residuos de galactosa en sus brazos exteriores biantenarios unidos por N. Todas las muestras mostraron la presencia de los tres picos representativos de las glucoformas G0, G1 y G2. La Figura 7 muestra una comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos G0, G1 y G2 de HPAEC-PED de cada muestra. Se observó la presencia de pequeños picos adicionales en los perfiles de todas las muestras remitidas. Los picos observados representan unos bajos niveles de las glucoformas mono y di-sialiladas.

10 **Análisis:** estos experimentos ensayaron la distribución relativa de los picos G0:G1:G2 de los cultivos anti-ABeta complementados con medio de alimentación en varias condiciones experimentales. Los cultivos en los que se añadieron Oligoelementos E mostraron una caída en los niveles de G0, con un correspondiente aumento en los niveles de G1 y G2 con respecto a las condiciones de cultivo que carecían de Oligoelementos E (Figura 7). Las condiciones de cultivo que contenían poca glutamina tenían un efecto similar, y los efectos eran aditivos. Los cultivos con poca glutamina (4 mM) a los que se les añadieron Oligoelementos E mostraron un cambio drástico en la distribución de las glucoformas unidas por N, con unas proporciones aproximadamente iguales de G0 y G1, y representando G2 aproximadamente el 10% del área del pico total (Figura 7). Los cultivos a los que se les añadieron Oligoelementos E contenían manganeso a una concentración de 156 nM. Sin embargo, debería mencionarse que los cultivos también contenían unos elevados niveles de otros metales. Por lo tanto, es posible que, además del manganeso, otras condiciones del cultivo contribuyan a la mejora observada en el patrón de glucosilación.

20 **Conclusión:** las diferencias en las distribuciones de glucosilación observadas en las muestras anti-ABeta son debidas más probablemente a los respectivos cambios en las condiciones de cultivo. Nuestros datos sugieren fuertemente que la presencia de poca glutamina (4 mM) y/o la adición de Oligoelemento E que contiene MnSO₄ 100 mM dan como resultado un cambio drástico en la distribución porcentual de las diversas glucoformas unidas por N en anti-ABeta. Estos efectos parecen ser independientes y aditivos.

25 **Ejemplo 5: análisis del oligosacárido unido por N de muestras de estudio anti-ABeta con manganeso**

Introducción: el Ejemplo 4 demostró que podían conseguirse mejoras en las distribuciones de glucosilación de las muestras anti-ABeta mediante la adición de Oligoelementos E a las condiciones de cultivo y manteniendo los niveles de glutamina bajos. Aquí ensayamos si la adición sólo de manganeso en las condiciones de cultivo podría efectuar una mejora similar en las distribuciones de glucosilación.

Procedimiento: se cultivaron cultivos Anti-ABeta en medios de cultivo que contenían o carecían de manganeso 40 mM. Los cultivos se alimentaron con un volumen total del 40% de medio de alimentación. Las muestras se recogieron y se analizaron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

5 **Análisis de los datos:** se compararon las muestras analizadas en términos de presencia de pico y del porcentaje del área total del pico para cada pico. La Figura 8 muestra una comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos de G0, G1 y G2 de HPAEC-PED de cada muestra.

10 **Análisis:** los tres tipos de glucanos complejos biantenarios unidos por N que se asociaron con el anticuerpo anti-ABeta son las estructuras G0, G1 y G2, que contienen respectivamente cero, uno o dos residuos de galactosa en sus brazos exteriores biantenarios unidos por N. Las muestras recogidas de las células cultivadas en medio que carece de, o que contiene, manganeso 40 mM, mostraron la presencia de los tres picos representativos de las glucoformas G0, G1 y G2. El pico de G0 disminuyó desde un área del pico total del 68% en la muestra de control hasta el 53% en la muestra recogida del medio que contiene el manganeso añadido (véase la Figura 8). Los aumentos en los porcentajes de las áreas de pico total de G1 y G2 también se observaron en la muestra recogida del medio que contenía manganeso. Los porcentajes de las áreas de pico total de G1 eran del 26% en la muestra de control, y del 39% en la muestra con manganeso añadido. Los porcentajes de las áreas del pico total de G2 eran del 6% en la muestra de control y del 9% en la muestra con manganeso añadido (Figura 8).

15 **Conclusión:** estos datos indican que la adición únicamente de manganeso al medio de cultivo da como resultado un patrón de glucosilación más amplio, según se demuestra por un cambio en la distribución porcentual G0:G1:G2 en estas muestras.

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una glucoproteína con un patrón de glucosilación mejorado en un cultivo celular, que comprende:
 - 5 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica una glucoproteína de interés en un medio de cultivo celular que comprende manganeso a entre aproximadamente 10 nM y 600 nM;
 - mantener el cultivo en un primer intervalo de temperatura durante un primer período de tiempo suficiente para permitir que las células se reproduzcan hasta una densidad celular viable en un intervalo de aproximadamente el 20% - 80% de la densidad celular viable máxima posible si el cultivo se mantiene en el primer intervalo de temperatura;
 - 10 cambiar el cultivo a un segundo intervalo de temperatura, siendo al menos una temperatura del segundo intervalo de temperatura menor que la temperatura menor del primer intervalo de temperatura;
 - mantener el cultivo durante un segundo período de tiempo en las condiciones y el tiempo suficientes para permitir la expresión de la glucoproteína,
 - 15 en el que el patrón de glucosilación de la glucoproteína expresada es más amplio que el patrón de glucosilación observado en unas condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carezca de manganeso.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer intervalo de temperatura comprende un intervalo de temperatura que es de aproximadamente 30 a 42 grados Celsius.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el primer intervalo de temperatura comprende una temperatura que es de aproximadamente 37 grados Celsius.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el segundo intervalo de temperatura comprende un intervalo de temperatura que es de aproximadamente 25 a 41 grados Celsius.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el segundo intervalo de temperatura comprende una temperatura que es de aproximadamente 31 grados Celsius.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente una segunda etapa de cambio subsiguiente a la primera etapa de cambio que comprende cambiar el cultivo a una tercera temperatura o intervalo de temperatura, siendo al menos una temperatura del tercer intervalo de temperatura menor que la menor temperatura del segundo intervalo de temperatura.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente 20 y 200 nM de manganeso.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 40 nM de manganeso.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio de cultivo celular comprende glutamina a una concentración inicial que es menor que o igual a aproximadamente 8 mM.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la concentración inicial de glutamina del medio de cultivo celular es menor que o igual a aproximadamente 4 mM.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el volumen del cultivo celular es de al menos aproximadamente 500 l.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el cultivo celular se provee adicionalmente con un medio de alimentación tras el comienzo del cultivo celular inicial.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el cultivo celular se provee adicionalmente con componentes complementarios.
14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que los componentes complementarios se eligen de entre el grupo constituido por hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones inorgánicos, tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos, aminoácidos, lípidos, glucosa u otras fuentes de energía, y combinaciones de los mismos.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el cultivo celular es complementado con aproximadamente 2 gramos por litro de glucosa.
16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el medio de cultivo celular está definido.

17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la glucoproteína de interés comprende el factor de coagulación IX.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el factor de coagulación IX es factor de coagulación IX humano recombinante.

5 19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la glucoproteína de interés comprende un anticuerpo anti-ABeta.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo anti-ABeta es un anticuerpo monoclonal.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el anticuerpo anti-ABeta es un anticuerpo monoclonal humanizado de un péptido anti-ABeta de IgG1.

10

Figura 1: Investigación de la actividad glucosídica en el material retenido en la UF/DF.

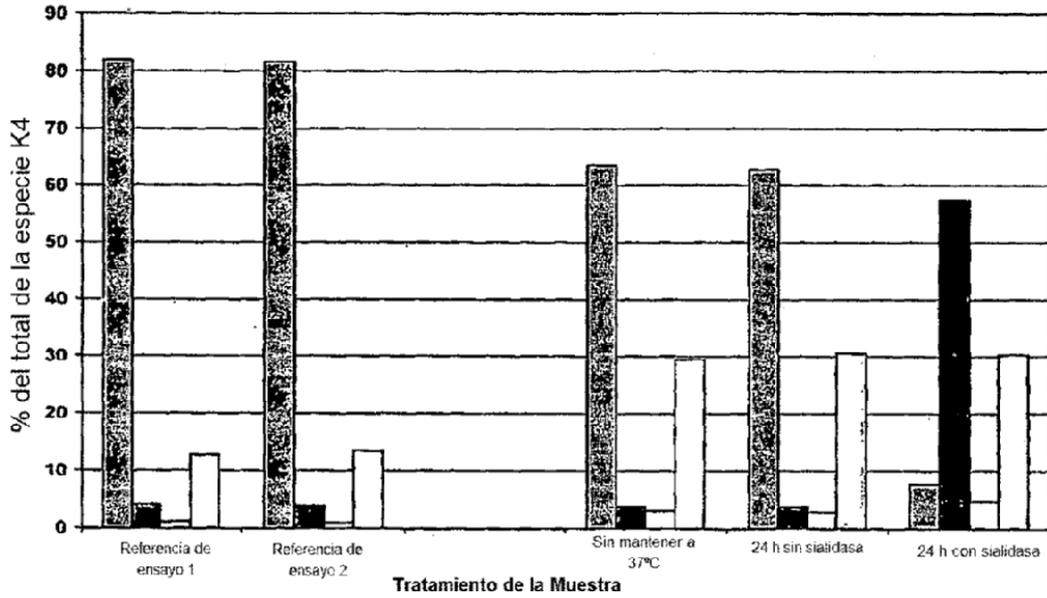


Figura 2: Distribuciones de las especies de K4 en el rFIX generado en cultivos en matraces con agitación

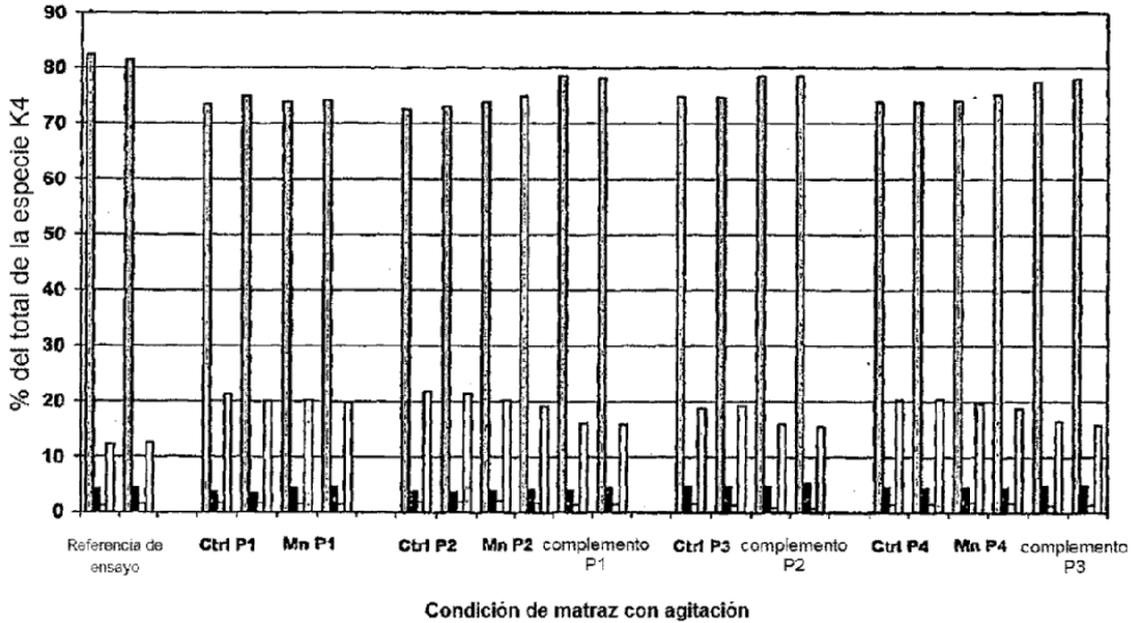


Figura 3: Distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con diversos aditivos en el medio

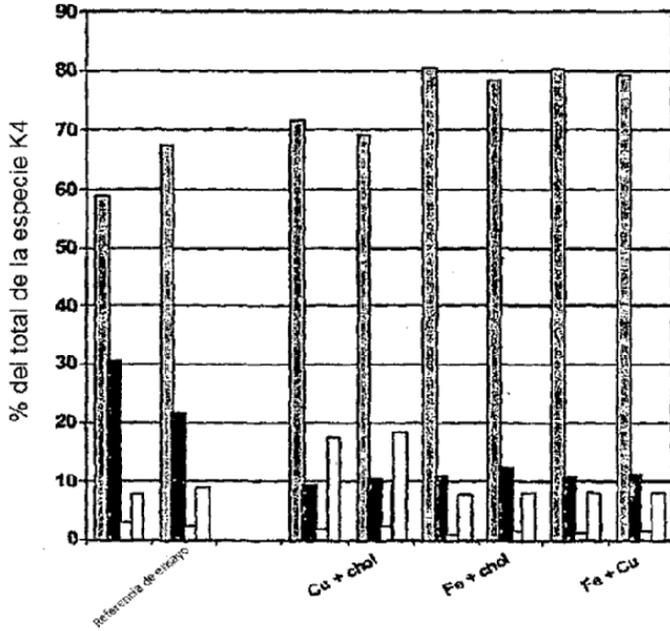


Figura 4: Distribución de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con medio complementado con PTR.

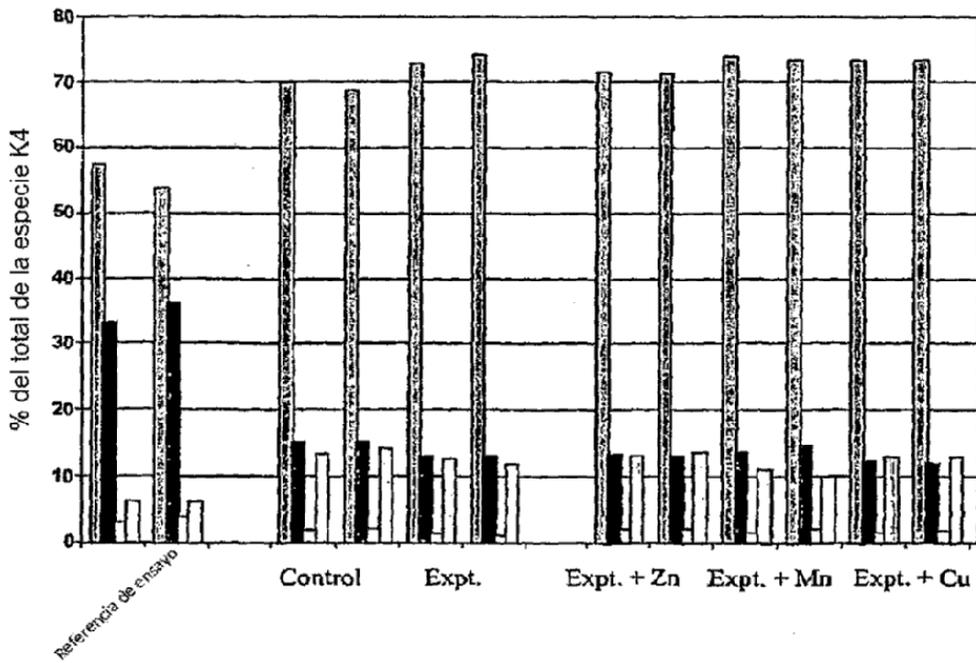


Figura 5: Distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con diversos aditivos en el medio.

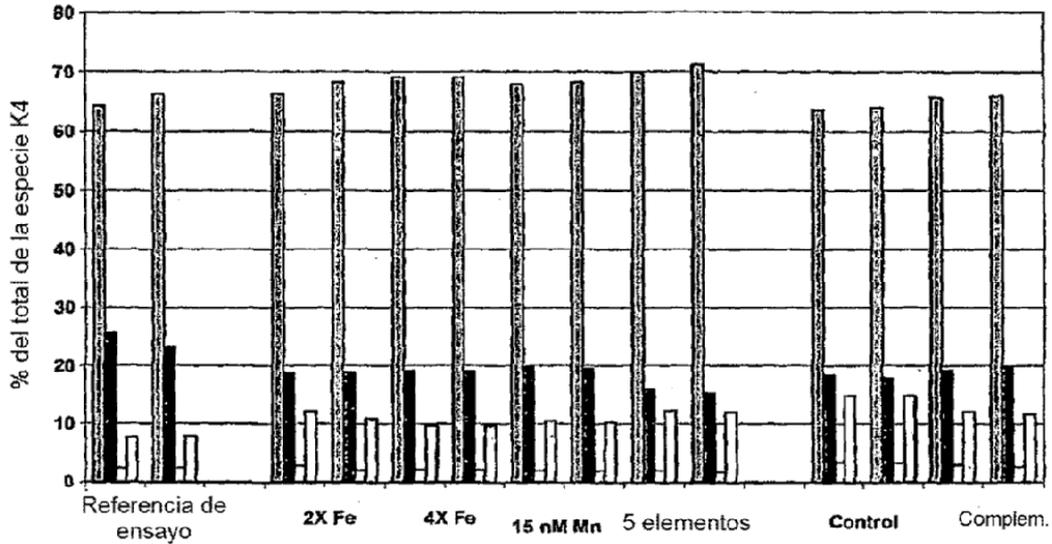


Figura 6: Distribuciones de las especies de K4 de cultivos en matraces con agitación con unos niveles de manganeso variables.

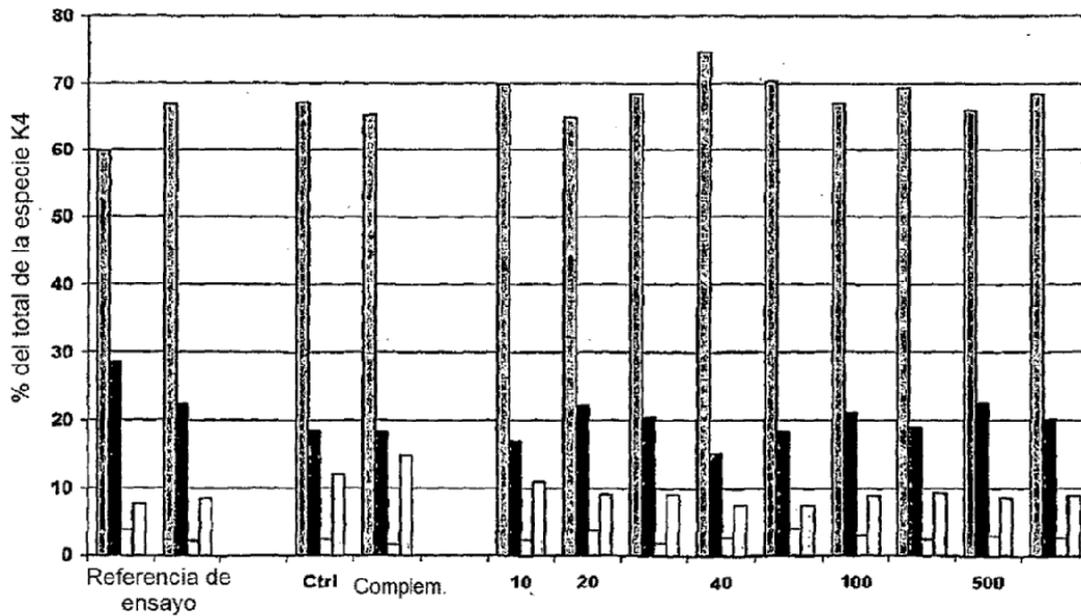


Figura 7: Comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos de G0, G1 y G2 de HPAEC-PED.

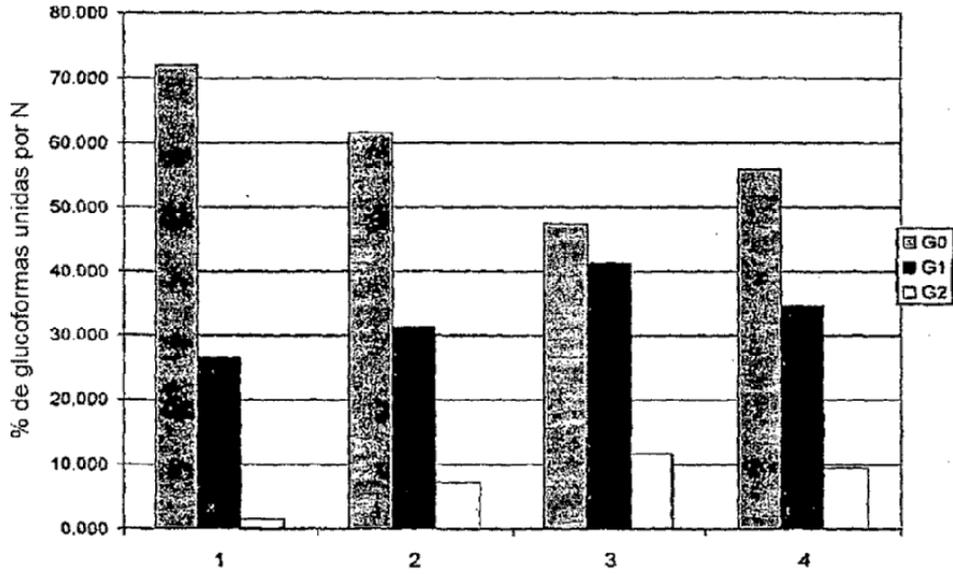


Figura 8: Comparación gráfica del porcentaje del área del pico total para los picos de G0, G1 y G2 de HPAEC-PED.

