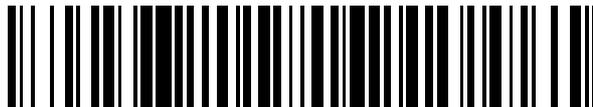


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 173**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2010 E 10721096 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2438171**

54 Título: **Células de fucosilación deficiente**

30 Prioridad:

02.06.2009 US 183400 P

27.05.2010 US 348858 P

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

21.01.2015

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

CHEN, GANG;

BURAKOV, DARYA y

FANDL, JAMES P.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 527 173 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

Células de fucosilación deficiente

5 Campo

La invención se refiere a una enzima de mamíferos modificada en la ruta de fucosilación, donde las células portadoras de la enzima de mamíferos modificada exhiben una capacidad reducida para fucosilar una proteína y a células que comprenden una modificación genética que tiene como resultado una capacidad reducida para fucosilar una proteína. La invención incluye una línea de células de mamífero (p. ej., líneas CHO) que expresa proteínas, incluidos anticuerpos, con una fucosilación reducida en comparación con las líneas celulares salvajes. La invención también se refiere a un control condicional de la fucosilación de proteínas.

15 Antecedentes

En la técnica se conocen líneas celulares que son incapaces de fucosilar proteínas. Se conocen numerosos mutantes de pérdida de función que son incapaces de fucosilar proteínas, quizá las más importantes determinadas mutantes de células de ovario de hámster chino (CHO) seleccionadas por la resistencia a determinadas lecitinas. Dichas líneas celulares se aíslan mediante selección repetida de la incapacidad para unirse a una lectina concentrada, por ejemplo la lectina Lens culinaris, en presencia de un mutágeno. Se conocen otras líneas celulares supuestamente incapaces de fucosilar proteínas, por ejemplo anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.425.466 y la patente de EE.UU. 7.214.775 (α 1, 6-fucosiltransferasa, es decir la mutante FUT8). El documento EP-A1-1.331.266 (Kyowa Hakko Kogyo KK) se refiere a células productoras de composiciones de anticuerpos. Sigue existiendo la necesidad en la técnica de líneas celulares con menor capacidad para fucosilar proteínas, en particular de células con menor capacidad de fucosilación en ausencia de un defectivo y de células que fucosilan de forma condicional proteínas.

Resumen

30 La proteína GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) modificada usada comprende una modificación 289S y es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1. En una realización, la proteína FX comprende una modificación 289S y al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en 79S, 90K, 136L, 211R, y una combinación de los mismos.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína FX, donde la proteína FX comprende una serina en la posición 289 y donde la proteína FX es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1. En una realización específica, el ácido nucleico es a.C. En una realización, se proporciona un vector de expresión o un vector dirigido que comprende el ácido nucleico. En una realización, el ácido nucleico del vector dirigido comprende un intrón. En una realización, el ácido nucleico del vector dirigido comprende un ADNC que codifica la proteína FX modificada. En una realización específica, el vector dirigido comprende una secuencia dirigida que dirige al vector hacia un locus en un genoma humano, de primate no humano, de hámster, de ratón o de rata.

45 En un aspecto, se proporciona una célula que es capaz de fucosilar una glicoproteína, donde la célula comprende un gen de la GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) modificada que tiene una modificación que codifica una proteína FX que es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1 y que comprende una serina en la posición 289, y donde no más del 10 % de la glicoproteína está fucosilada cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa. En una realización, la célula no expresa o no expresa sustancialmente una proteína FC salvaje. En una realización específica, la célula exhibe no más del 10 %, no más del 5 %, no más del 2 % o no más del 1 % de la proteína FX salvaje en comparación con una célula que carece de la modificación.

50 En una realización, la célula que comprende la proteína FX modificada o el ácido nucleico expresa una glicoproteína que contiene Fc, donde la célula fucosila no más del 90 %, no más del 95 %, no más del 96 %, no más del 97 %, no más del 98 % o no más del 99 % de la glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación.

55 En un aspecto, la célula proporcionada comprende una modificación en un ácido nucleico que codifica una proteína FX o que expresa una proteína FX con una modificación, donde la célula carece o carece sustancialmente de la capacidad para fucosilar una glicoproteína a una primera temperatura, pero no carece o no carece sustancialmente de la capacidad para fucosilar la glicoproteína a una segunda temperatura.

60 En una realización, la primera temperatura es de aproximadamente 37 °C. En una realización, la segunda temperatura es de aproximadamente 34 °C.

65 En una realización, la capacidad para fucosilar la glicoproteína a la primera temperatura es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % de la capacidad para fucosilar la glicoproteína exhibida por una célula que carece de la

modificación. En una realización, la capacidad para fucosilar la glicoproteína a la segunda temperatura es de aproximadamente 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con la capacidad para fucosilar la glicoproteína por una célula que carece de la modificación.

5 La modificación de la proteína FX usada comprende una sustitución de aminoácido que es 289S y que puede proporcionarse en combinación con cualquiera de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 90K, 211R, 136L, 79S.

10 En una realización, la proteína FX procede de un primate no humano (p. ej., *Macaca mulatta*), un ser humano, un ratón (p. ej., *Mus musculus*), una rata (p. ej., *Rattus norvegicus*) o un hámster (p. ej., hámster chino o *Cricetulus griseus*). En una realización específica, la proteína FX comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5 o SEC ID N° 6, y porta una o más modificaciones (p. ej., sustituciones de aminoácidos) como se describe en el presente documento. La proteína FX tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N° 1.

15 El ácido nucleico codifica una proteína FX que es al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEC ID N° 1 y comprende 289S y también puede comprender uno o más de los siguientes aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones: 79S, 90K, 136L, 211R y 289S, los siguientes aminoácidos en una o más de las posiciones siguientes: 79S, 90K, 136L y 211R.

20 En una realización, el ácido nucleico codifica una FX que es al menos un 95 % idéntica a la FX de la SEC ID N° 2. En una realización específica, la FX tiene la secuencia de aminoácidos de la SE ID N° 2.

[Eliminado]

25 En una realización, la célula expresa una enzima de la ruta de fucosilación salvaje seleccionado del grupo que consiste en GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), una GDP-β-L-fucosa pirofosforilasa (GFPP) salvaje, una α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) salvaje y una combinación de los mismos.

30 En un aspecto, la célula es una célula de mamífero capaz de fucosilar una proteína, donde la célula comprende una modificación en un gen FX, donde la modificación tiene como resultado una reducción de al menos un 90 % en la capacidad de la célula para fucosilar una proteína en comparación con una célula que carece de la mutación o alteración.

35 En una realización, la reducción es de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en comparación con una célula de mamífero que no contiene la modificación.

40 En una realización, la comparación de una célula modificada de acuerdo con la invención y una célula que no comprende la modificación se realiza en las mismas condiciones o esencialmente en las mismas condiciones (p. ej., medio, temperatura, densidad celular etc.).

45 En una realización, la célula se selecciona de una célula COS, CHO, 293, BHK, HeLa, Vero, una célula de mamífero transfectada con genes de adenovirus, por ejemplo AD5 E1, incluyendo, entre otras, una célula de retina humana inmortalizada transfectada con un gen de adenovirus, por ejemplo una célula PER.C6™ y una célula NSO. En una realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una realización específica, la célula CHO es una célula CHO K1.

50 La modificación es 289S. En una realización específica, la sustitución comprende 289S y una o más de 79S, 90K, 136L y 211R.

En una realización, la célula comprende un gen FX que codifica una proteína que comprende la secuencia de SEC ID N° 1, con la sustitución de aminoácido L289S. En una realización específica, la sustitución de aminoácido comprende L289S y una o más de N79S, N90K, P136L, y G211R.

55 En una realización, la célula comprende además al menos un ácido nucleico que codifica una proteína inmunoglobulina. En una realización específica, la proteína inmunoglobulina es una proteína humana o una proteína de ratón. En una realización específica, la proteína inmunoglobulina comprende una cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización específica, la proteína inmunoglobulina comprende una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, por ejemplo un isotipo IgG1 humano. En una realización, la región variable de la cadena pesada y/o ligera comprende una CDR humana. En otra realización, una CDR de ratón, en otra realización una CDR humanizada de un ratón o un primate no humano.

65 En una realización, la célula comprende un ácido nucleico que codifica un dominio CH2 y un dominio CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

- En una realización, la proteína es una proteína de unión a antígeno. En una realización específica, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. En realizaciones específicas, el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo an IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo de isotipo IgG1.
- 5 En una realización, la proteína es un anticuerpo y solo el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,5 % de la proteína anticuerpo fabricada por la célula está fucosilado. En una realización, la cantidad de proteína anticuerpo fabricada que está fucosilada se mide mediante desglucosilación durante la noche de una proteína anticuerpo con PNGasa F, seguido de análisis con oligosacárido mediante HPLC, SEC ID N° los oligosacáridos que contienen fucosilo se cuantifican mediante integración del área del pico de glicano y, por ejemplo, la fucosilación de la proteína se calcula en base al área del pico de glicano. En una realización específica, los glicanos fucosilados se identifican mediante espectroscopia de masas.
- 10 En un aspecto, se hace referencia a un método para fabricar una proteína de unión a antígeno, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula de la invención; (b) introducir en la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígeno; (c) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar la secuencia de ácido nucleico para producir la proteína de unión a antígeno y (d) recuperar la proteína de unión a antígeno expresada por la célula.
- 15 En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización específica, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico humano/de ratón y un anticuerpo de primate no humano.
- 20 En una realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 25 En una realización, la reducción en la capacidad de la célula para fucosilar una proteína es del 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % en comparación con una célula que carece de la modificación en el gen de FX.
- 30 La modificación es 289S. En una realización, la modificación comprende 289S y al menos uno de 79S, 90K, 136L y 211R.
- En una realización, el gen de la fucosiltransferasa codifica una proteína que comprende la secuencia de SEC ID N° 1, con la sustitución de aminoácido L289S. En una realización, la modificación comprende L289S y al menos uno de N79S, N90K, P136L y G211R.
- 35 En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humano o fragmento del mismo. En una realización específica, el anticuerpo es un isotipo IgG1, por ejemplo una IgG1 humana.
- 40 En una realización, el anticuerpo recuperado tiene no más de aproximadamente un 5 % de fucosilación en comparación con el mismo anticuerpo fabricado en una célula salvaje que carece de la modificación. En otra modificación, no más del 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,5 % de fucosilación en comparación con el mismo anticuerpo fabricado en una célula salvaje que carece de la modificación.
- 45 En un aspecto, la célula proporcionada expresa una enzima de la ruta de fucosilación salvaje seleccionada del grupo que consiste en GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), una GDP-β-L-fucosa pirofosforilasa (GFPP) salvaje, una α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) salvaje, y una combinación de las mismas; donde la célula comprende un gen de FX modificado, SEC ID N° la célula tiene una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación en el gen de FX.
- 50 En una realización específica, la glicoproteína comprende una Fc. En una realización, la proteína es un anticuerpo. En una realización, la proteína comprende una secuencia de una IgG. En una realización específica, la secuencia de una IgG es una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una combinación de las mismas. En una realización específica, la proteína es un anticuerpo y el anticuerpo comprende una Fc que tiene una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3, y/o IgG4.
- 55 En una realización, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, de retina humana (p. ej., PER.C6T™), Vero o HeLa.
- 60 En un aspecto se proporciona un método para fabricar una glicoproteína, que comprende: cultivar una célula de mamífero que comprende un gen de FC que codifica una proteína FX con una serina en la posición 289 y donde la proteína FX es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1, a una temperatura de 37 °C y en ausencia de una fuente de fucosa externa, donde la célula expresa una glicoproteína que comprende una región CH2 de inmunoglobulina y una región CH3 de inmunoglobulina, y asilar la glicoproteína del cultivo.
- 65

En una realización, el método para fabricar una glicoproteína proporcionada comprende cultivar una célula CHO que expresa la glicoproteína en medio de cultivo en condiciones suficientes para que la célula CHO exprese la glicoproteína y recuperar de la célula CHO o el medio de cultivo la glicoproteína expresada. En una realización, la glicoproteína expresada no está más de aproximadamente un 5 % fucosilada. En una realización, no más de
 5 aproximadamente un 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,5 % está fucosilada. En una realización específica, el porcentaje de fucosilación es un porcentaje molar de fucosa en glicano. En una realización específica, el porcentaje de fucosilación es un porcentaje molar de fucosa en glicoproteína. En una realización específica, la proporción molar entre la proteína no fucosilada y la fucosilada es de aproximadamente 0,90 a 0,10, de aproximadamente 0,91 a 0,09, de
 10 aproximadamente 0,92 a 0,08, de aproximadamente 0,93 a 0,07, de aproximadamente 0,94 a 0,06, de aproximadamente 0,95 a 0,05, de aproximadamente 0,96 a 0,04, de aproximadamente 0,97 a 0,03, de aproximadamente 0,98 a 0,02, o de aproximadamente 0,99 a 0,01.

En una realización, la glicoproteína comprende una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina que tiene una posición 297 (numeración de la UE) el siguiente resto glicano: GlcNAc(1) unido a la glicoproteína a través de un enlace N;
 15 GlcNAc(1)-GlcNAc(2)-Manosa(1), donde la manosa(1) porta un primero y un segundo restos, SEC ID N° el primer resto consiste esencialmente en Manosa(2)-ManGlcNAc(3); y SEC ID N° el segundo resto consiste esencialmente en Manosa(3)-GlcNAc(4). En una realización, el resto hidrato de carbono consiste además esencialmente en una Gal(1) unida a GlcNAc(4). En otra realización, el resto hidrato de carbono consiste además esencialmente en una
 20 Gal(1) unida a GlcNAc(4) una Gal(2) unida a GlcNAc(3).

En una realización, la glicoproteína fucosilada comprende un resto glicano idéntico al resto glicano no fucosilado descrito en el párrafo inmediatamente anterior a este párrafo, pero también porta un resto fucosa en GlcNAc(1).

En la célula proporcionada modificada genéticamente, la modificación está en un gen de FX y donde la modificación
 25 tiene como resultado la célula productora de un ARNm de FX que codifica una proteína FX que tiene el aminoácido 289S; y la célula exhibe una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación en el gen de FX. En una realización, el ARNm codifica una proteína FX que comprende una serina en posición 289, que además comprende al menos uno de 79S, 90K, 136L, 211R.

En la célula proporcionada modificada genéticamente, la modificación está en un gen de FX y la modificación altera un codón del gen de FX de forma que el gen de FX modificado codifica una proteína FX que tiene una serina en la
 30 posición 289. En una realización, la proteína FX comprende una serina en la posición 289 y al menos una lisina en la posición 90, una leucina en la posición 136 y/o una arginina en la posición 211.

En una realización, la célula además expresa una proteína que contiene Fc. En una realización, la proteína que
 35 contiene Fc es un anticuerpo.

En una realización, la célula glicosila la proteína que contiene FX pero no fucosila sustancialmente la proteína que
 40 contiene Fc glucosilada. En una realización específica, la glucosilación es de aproximadamente no más del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,5 % de la fucosilación de la proteína que contiene Fc glucosilada en comparación con una célula que carece de la modificación del gen de FX.

En una realización, la glicosilación comprende un grupo trimanosilo biantenal. En una realización, la proporción
 45 molar entre fucosa y el grupo trimanosilo biantenal es de no más de aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una realización, la proporción molar entre fucosa y el grupo trimanosilo biantenal en la proteína que contiene Fc fucosilada es de no más de aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200.

En una realización, la proteína que contiene Fc es un anticuerpo y la glicosilación comprende un resto glicano en la
 50 posición 297 de la Fc. En una realización, la proporción molar entre la fucosa y el resto glicano es de no más de aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 200. En una realización, el resto glicano comprende dos residuos GlcNAc en tándem seguidos de un resto trimanosilo biantenal, SEC ID N° cada uno de dos restos manosilo terminales del resto trimanosilo porta un residuo GlcNAc. En una realización, la proporción molar entre fucosa y GlcNAc en el glicano es de no más de 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400, o 1:800.

En un aspecto, la célula proporcionada es una célula de mamífero modificada que expresa ectópicamente una
 55 glicoproteína, SEC ID N° la modificación comprende una secuencia de ácido nucleico de FX modificado y la célula comprende una ruta de rescate de fucosa y una ruta de síntesis de fucosa de novo y expresa una proteína FUT 8 funcional y una proteína GMD funcional, SEC ID N° la ruta de síntesis de fucosa de novo es incapaz de fucosilar sustancialmente una glicoproteína debido a la modificación de la secuencia de ácido nucleico de FX a
 60 aproximadamente 37 °C, pero es capaz de fucosilar sustancialmente la glicoproteína a aproximadamente 34 °C.

Se pretende usar los aspectos y realizaciones individuales descritos en el presente documento solos o en combinación con cualquier otro aspecto o realización, a menos que se indique expresamente lo contrario o a menos que dicha combinación no esté permitida por el contexto.

Breve descripción de las figuras

- La FIG. 1 muestra una alineación MacVector™ para la secuencia de la proteína FX (de arriba a abajo) de mono (*Macacca mulatta*), SEC ID N° 3; de ser humano, SEC ID N° 4; de ratón (*Mus musculus*), SEC ID N° 5; de rata (*Rattus norvegicus*), SEC ID N° 6; CHO (*Cricetulus griseus*), SEC ID N° 1; y de CHO con una modificación L289S y N90K (denominada línea celular 8088), SEC ID N° 2.
- La FIG. 2 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 3033, 6066, 7077 y 8088 antes y después de la tinción con LCA.
- La FIG. 3 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 4044-1 no teñidas e histogramas de las células 4044-1, 6069, 2020, y 2121 teñidas con LCA.
- La FIG. 4 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 5055 no teñidas e histogramas de las células 5055, 8088 y 1010 teñidas con LCA.
- La FIG. 5 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 4044-1 y 6066-1 cultivadas a 37 °C y a 34 °C antes y después de la tinción con LCA.
- La FIG. 6 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 3033, 7077, 8088, y 1010 cultivadas en medio con y sin L-fucosa 5 mM e histogramas de las células 5055 cultivadas en medio sin L-fucosa. Todas las células se tiñeron con LCA.
- La Fig. 7 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 8088 transfectadas de forma estable con pR4009, pR4010, y pR4011, y de las células 5055.
- La Fig. 8 muestra a separación de glicano mediante HPLC para Ab 3.1 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa (1,45 % de fucosilación).
- La Fig. 9 muestra los resultados de espectrometría de masas para los glicanos de la Fig. 8; las estructuras de glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan por cuadrados; los residuos de manosa se representan por círculos; los residuos de galactosa se representan por rombos.
- La Fig. 10 muestra a separación de glicano mediante HPLC para Ab 3.1 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en presencia de fucosa 10 mM (95,22 % de fucosilación).
- La Fig. 11 muestra los resultados de espectrometría de masas para los glicanos de la Fig. 10; las estructuras de glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan por cuadrados; los residuos de manosa se representan por círculos; los residuos de galactosa se representan por rombos; los residuos de fucosa se representan con triángulos.
- La Fig. 12 muestra a separación de glicano mediante HPLC para Ab 3.2 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa (5,73 % de fucosilación).
- La Fig. 13 muestra los resultados de espectrometría de masas para los glicanos de la Fig. 12; las estructuras de glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan por cuadrados; los residuos de manosa se representan por círculos; los residuos de galactosa se representan por rombos.
- La Fig. 14 muestra a separación de glicano mediante HPLC para Ab 3.2 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en presencia de fucosa 10 mM (95,63 % de fucosilación).
- La Fig. 15 muestra los resultados de espectrometría de masas para los glicanos de la Fig. 14; las estructuras de glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan por cuadrados; los residuos de manosa se representan por círculos; los residuos de galactosa se representan por rombos; los residuos de fucosa se representan con triángulos.
- La Fig. 16 resume los resultados de los estudios de espectrometría de masas sobre líneas celulares salvajes y de fucosilación baja. Los residuos de GlcNAc se representan por cuadrados; los residuos de manosa se representan por círculos; los residuos de galactosa se representan por rombos; los residuos de fucosa se representan con triángulos.

Descripción

La invención no está limitada a métodos y condiciones experimentales concretos descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. La terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante, ya que la invención está abarcada por las reivindicaciones concedidas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y frases usadas incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en la técnica, a menos que claramente se indique lo contrario o que claramente sea evidente a partir del contexto SEC ID N° se usa el término o frase. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos, a continuación se describen métodos y materiales concretos.

Con la referencia al singular (por ejemplo, “uno” o “el”) se pretende abarcar la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente que la referencia al plural está excluida.

El término “anticuerpo” incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada (CH). La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende

una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas que se denominan regiones estructurales (FR). Cada VH y VL comprenden tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi, en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada se pueden abreviar a HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera se pueden abreviar a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una KD con respecto a su epítipo diana de aproximadamente 10^{-9} M o menor (p. ej., de aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o de aproximadamente 1×10^{-12} M). En una realización, la KD se mide mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo BIACORE™; en otra realización, la KD se mide mediante ELISA.

La frase "proteína de unión" incluye cualquier proteína que sea capaz de reconocer específicamente una pareja de unión. Reconocimiento específico generalmente requiere que la proteína de unión se una a su pareja de unión con una constante de disociación (KD) no superior a un poco micromolar y, en la mayoría de los casos, las proteínas de unión deseables se unen a sus parejas de unión en el rango nanomolar, por ejemplo, en varias realizaciones del orden de menos un ciento nanomolar. La mayoría de las proteínas de unión descritas en el presente documento son también proteínas que contienen Fc, es decir comprenden un resto de unión condensado con una Fc que comprende al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Las proteínas de unión típicas son anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), inmunoadhesinas, trampas (p. ej., trampas de citoquina tales como trampas de IL-1, trampa de VEGF, etc.). Las proteínas de unión típicas que no son anticuerpos portan un resto de unión (p. ej., un receptor o fragmento del mismo, un ligando o fragmento del mismo, una variación en un dominio variable de inmunoglobulina canónico etc.) y un resto de inmunoglobulina que con frecuencia comprende un dominio de inmunoglobulina CH2 y CH3 (o fragmento del mismo que conserva una función efectora de Fc). Por tanto, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para producir proteínas de unión (p. ej., que incluyen inmunoadhesinas y trampas) portadoras de una región de inmunoglobulina que se une a un receptor de Fc y/o que activa el complemento (p. ej., una región CH2 y CH3 funcional) y, de este modo, es capaz de mediar en la ADCC y/o la CDC.

Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos de diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos de más de un polipéptido diana. Se pueden producir proteínas de unión multiespecíficas que son biespecíficas que comprendan dos brazos de inmunoglobulina, por ejemplo en las el primer brazo de una inmunoglobulina es específico de un primer epítipo y el segundo brazo de la inmunoglobulina es específico de un segundo epítipo. Otras proteínas de unión multiespecíficas incluyen aquellas en las que el segundo brazo porta un resto de unión un ligando o un receptor o fragmento de unión al mismo) que se une específicamente a una diana que es una pareja de unión a proteína o no proteína.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, cada cadena pesada se une específicamente a un epítipo diferente en dos moléculas diferentes (por ejemplo, diferentes epítopos en diferentes antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, diferentes epítopos en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse de forma selectiva a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo generalmente será al menos uno o dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y al contrario. Los epítopos unidos específicamente por el anticuerpo biespecífico puede estar sobre la misma diana o sobre una diferente (p. ej., sobre la misma proteína o sobre una diferente). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir, por ejemplo, combinando las cadenas pesadas que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias variables de la cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno se pueden condensar a secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas regiones constantes de la cadena pesada u otras diferentes, y dichas secuencias se pueden expresar en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguido de (N-terminal a C-terminal) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a epítipo pero que se puede asociar con cada cadena pesada o que se puede asociar con cada cadena pesada y que se puede unir a uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión del epítipo de la cadena pesada, o que se pueden asociar con cada cadena pesada y permitir la unión o uno o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

Un ejemplo de un formato de proteína de unión biespecífica usa un primer dominio CH3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio CH3 de Ig, SEC ID N° el primer y segundo dominio CH3 de Ig difieren uno de otro en al menos un aminoácido y donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la Proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio CH3 de Ig se une a la Proteína A y el segundo dominio CH3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a la Proteína A, tal como una modificación 435R (mediante la numeración UE; 95R con la numeración UE; 96F mediante la numeración IMGT). La segunda CH3 puede además comprender una modificación 436F (mediante la numeración UE; 96F mediante la numeración IMGT). Modificaciones adicionales que se pueden encontrar dentro de la segunda CH3 incluyen 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, y 422I (mediante la numeración UE; 16E, 18M, 44S,

52N, 57M, y 82I mediante la numeración IMGT). En este formato, el primer dominio CH3 de Ig se condensa con un primer resto de unión (por ejemplo, un primer dominio variable de Ig que se une específicamente a un primer epítipo) y el segundo dominio CH3 de Ig se condensa con un segundo resto de unión (p. ej., un segundo dominio variable de Ig que se une específicamente a un segundo epítipo, donde el primero y el segundo epítipo son diferentes).

El término "célula" incluye cualquier célula que es adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen eucariotas (una célula o múltiples células), células de levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (p. ej., SF-9, SF-21, células de insecto infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. Las células que no comprenden de forma natural una ruta para la fucosilación pueden modificarse genéticamente para contener una (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2010/0028951A1), y la célula se puede modificar para usar un gen de FX que está modificado como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la célula es una célula de ser humano, mono, simio, hámster, rata o ratón. En algunas realizaciones, la células es eucariótica y se selecciona de las siguientes células: CHO (p. ej., CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (p. ej., COS-7), hámster sirio, mieloma de rata, mieloma de ratón (p. ej., SP2/0, NSO), célula de la retina, Vero, CV1, de riñón (p. ej., HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma humano, célula tumoral, célula de linfoma humano (p. ej., una célula Namalwa) y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, la célula es una célula retiniana que expresa un gen viral (p. ej., una célula PER.C6™).

La frase "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una "porción funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que se puede unir a un receptor de Fc (p. ej., un FcγR o an FcRN y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene deleciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que las convierten en incapaces de unirse a cualquier receptor de Fc y también incapaces de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

Las proteínas que contienen FC pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluyendo cuando las modificaciones afectan a una o más funciones efectoras de la proteína de unión (p. ej., modificaciones que afectan a la unión a FcγR, la unión a FcγN y, por tanto, la semivida y/o la actividad CDC). Dichas modificaciones incluyen, entre otras, las siguientes modificaciones y combinaciones de las mismas, con referencia a la numeración UE de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, y 439. Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión puede exhibir una semivida en suero potenciada y tener una modificación en las posiciones 252, 254 y 256; o una modificación en 428 y/o 433 y/o 434; o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308, y 434.

El término "FX" se refiere a una proteína que exhibe actividad GDP-4-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa o a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene actividad GDP-4-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa. La mayoría de los ejemplos descritos en el presente documento se refieren a FX de *C. griseus* salvaje o a FX de *C. griseus* que está modificada de acuerdo con la invención. No obstante, "FX" no está limitado a la referencia a una célula CHO. Como se muestra en la FIG. 1, una alineación de secuencias de FX de *Macaca mulatta*, ser humano, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* revela un grado muy alto de conservación, es decir las secuencias de FX de varios organismos son muy muy similares. En base a este grado de identidad, cabe esperar que las pequeñas diferencias en la secuencia que existen entre estas especies no afecten sustancialmente a la actividad de FX. Las diferencias entre la secuencia de FX de CHO (SEC ID N° 1) y las secuencias de mono (SEC ID N° 3), de ser humano (SEC ID N° 4), de ratón (SEC ID N° 5) y de rata (SEC ID N° 6) incluyen las siguientes: 5H, 8M, 21K, 37D, 51T, 55R, 59E, 62R, 93M, 106A, 107C, 138N, 161Y, 167S, 177Y, 201S, 202S, 202D, 212N, 225Q, 235S, 266H, 266N, 266S, 273T, 274S, 280F, 287S, 291T, 291S, 297C, 310D, 314E. Para la FX de CHO salvaje de 321 aminoácidos (SEC ID N° 1), se puede revisar una cualquiera de las secuencias de FX de mono, de ser humano, de ratón y de rata seleccionando de 31 sustituciones diferentes o $31/321 \times 100 = 9,6\%$ de la secuencia de FX de CHO salvaje. Por tanto, una FX modificada de la invención incluye una FX de CHO salvaje (p. ej., SEC ID N° 1) o una FX que tiene al menos una identidad del 90,4 % con una FX de CHO salvaje y también portadora de la sustitución L289S. Para menos desviaciones de la SEC ID N° 1, una FX modificada de la invención tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEC ID N° 1 y porta la modificación L289S. Un experto esperaría que una o más de una inserción pequeña o una o más de una deleción pequeña que incluye al menos una de la posición 79, 90, 136, 211, y 289 con mayor probabilidad también proporcionaría ventajas asociadas con una realización de la invención (p. ej., una célula portadora del gen modificado exhibiría una fucosilación reducida de una glicoproteína).

En una realización específica, la FX comprende una primera sustitución que es 289S y una o más de las segundas sustituciones.

5 La frase “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” hace referencia a una capacidad menor o reducida de una célula modificada para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula normal o salvaje. La glicoproteína puede ser una glicoproteína endógena. Más típicamente, la modificación del ácido nucleico se realiza en una célula que se usa para expresar una glicoproteína heteróloga, por ejemplo una célula que expresa una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo o anticuerpo biespecífico o una inmunoadhesina u otra glicoproteína que contiene FC) ectópicamente. Por ejemplo, una línea celular CHO o PERC.6™ modificada de acuerdo con la invención, que
10 también expresa un anticuerpo humano, por ejemplo un anticuerpo IgG1 humano.

En general, la referencia a “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” con respecto a una glicoproteína no se refiere a una única molécula glicoproteína que tiene menos residuos de fucosa unidos a ella. En su lugar, se hace referencia a una preparación glicoproteica preparada a partir de células y la preparación glicoproteica comprende
15 una población de moléculas glicoproteicas individuales, teniendo los miembros de la población diferentes características de glicosilación. Con fines ilustrativos y no limitantes, para un anticuerpo IgG1 expresado en una célula CHO modificada de acuerdo con la invención, “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” se refiere a un número más pequeño de glicoproteínas individuales que tienen un residuo de fucosa sobre un residuo GlcNAc unido a N de un glicano en la posición 297 de la Fc. Dicha “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” se puede caracterizar de diversos modos (véase en otro lugar en el presente documento), pero en cada caso se hace referencia a un número relativamente bajo (o reducido) de las glicoproteínas de la población que tienen residuos de fucosa sobre ellas en comparación con una población de la misma glicoproteína producida en una línea celular que carece de una modificación de acuerdo con la invención.

25 A modo de ilustración, si una glicoproteína producida de acuerdo con la invención está fucosilada un 1 % en comparación con la misma glicoproteína producida e una célula salvaje, solo el 1 % de las moléculas de la proteína que contiene FC están fucosiladas en la célula de la invención en comparación con la cantidad de fucosilación observada en una correspondiente célula salvaje (fijada de forma arbitraria en 100 %, estén o no todas las moléculas de la proteína que contiene Fc fucosiladas en la célula salvaje en las mismas condiciones).

30 En una célula con “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” de acuerdo con la invención, la fucosilación de una glicoproteína se reduce aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En una realización específica, la reducción es de aproximadamente 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En otra realización específica, la reducción es de aproximadamente 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 % o 98,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En otra realización específica, la reducción es de aproximadamente 97,1 %, 97,2 %, 97,3 %, 97,4 %, 97,5 %, 97,6 %, 97,7 %, 97,8 % o 97,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En otra realización específica, la reducción es de aproximadamente 96,1 %, 96,2 %, 96,3 %, 96,4 %, 96,5 %, 96,6 %, 96,7 %, 96,8 % o 96,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En otra realización específica, la reducción es de aproximadamente 95,1 %, 95,2 %, 95,3 %, 95,4 %, 95,5 %, 95,6 %, 95,7 %, 95,8 % o 95,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación. En otra realización específica, la reducción es de aproximadamente 94,1 %, 94,2 %, 94,3 %, 94,4 %, 94,5 %, 94,6 %, 94,7 %, 94,8 % o 94,9 % en comparación con una célula que no contiene la modificación.

45 Una preparación glicoproteica producida en una célula de acuerdo con la invención está fucosilada únicamente aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un t 0,2 %, o aproximadamente un 0,1 % de la cantidad de fucosilación de la misma glicoproteína producida en una célula que no contiene la modificación.

Otro modo de caracterizar una preparación glicoproteica de una célula de “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” es mediante la proporción entre glicoproteínas fucosiladas y no fucosiladas en la preparación glicoproteica producida por la célula. Por ejemplo, una preparación glicoproteica producida por una célula modificada tiene una proporción entre glicoproteína fucosilada: glicoproteína no fucosilada que es de aproximadamente 1:10 a 1:15, 1:15 a 1:20, 1:20 a 1:40, 1:40 a 1:60, 1:60 a 1:80, 1:80 a 1:100, o 1:100 a 1:150.

Otro modo de caracterizar una preparación glicoproteica de una célula de “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” es mediante el porcentaje en peso relativo de la glicoproteína no fucosilada (en comparación con la glicoproteína total, es decir fucosilada y no fucosilada). Por ejemplo, una preparación glicoproteica producida por una célula modificada tiene un porcentaje de glicoproteína no fucosilada que es de aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 99,5 % en comparación con la misma preparación glicoproteica de una célula que carece de la modificación.

65

Otro modo de caracterizar una preparación glicoproteica de una célula con “fucosilación baja” o “fucosilación reducida” es mediante la cantidad relativa del componente fucosa a glicano o una cantidad relativa del componente fucosa a glicano de la preparación glicoproteica. Por ejemplo, en el caso de las proteínas que contienen Fc (p. ej., anticuerpos), la glicosilación comprende un glicano en la posición 297 y el glicano comprende un resto de trimanosilo biantenal. En una realización, la proporción molar entre la fucosa y el resto glicano es no más de aproximadamente 1:20, 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una realización, la proporción entre la fucosa y el resto trimanosilo biantenal es de no más de aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una realización, la proporción molar entre la fucosa y el resto trimanosilo biantenal en la proteína que contiene Fc fucosilada es de no más de aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una realización, el resto glicano comprende dos residuos GlcNAc en tándem seguidos de un resto de trimanosilo biantenal, donde cada uno de los dos restos de manosilo antenales terminales del resto trimanosilo portan un residuo de GlcNAc. En una realización, la proporción molar entre fucosa y GlcNAc en el glicano es de no más de 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400, o 1:800.

En una realización, la cantidad de proteína anticuerpo fabricada que está fucosilada se mide mediante desglucosilación durante la noche de una proteína anticuerpo con PNGasa F, seguido de análisis con oligosacárido mediante HPLC, SEC ID N° los oligosacáridos que contienen fucosilo se cuantifican mediante integración del área del pico de glicano y, por ejemplo, la fucosilación de la proteína se calcula en base al área del pico de glicano. La identidad (y la composición) del glicano se puede determinar y/o cuantificar) mediante cualquier procedimiento adecuado (p. ej., espectrometría de masas).

La frase “salvaje” incluye una referencia a una célula o a una actividad que no está modificada de acuerdo con la invención, por ejemplo una célula que no contiene una secuencia de ácido nucleico de FX modificada o una proteína FX modificada. La actividad FX “salvaje” incluye la referencia a cualquier parámetro de actividad (p. ej., actividad enzimática) que exhibe un gen o proteína FC natural o no modificada. Al comparar la actividad “salvaje” de una proteína FX y la actividad de una proteína FX modificada, la proteína FX “salvaje” y la proteína FX modificada se aíslan sustancialmente del mismo modo a partir de sustancialmente la misma fuente (p. ej., el mismo tipo celular, el mismo organismo) y se comparan en sustancialmente las mismas condiciones. Al comparar la actividad de FX “salvaje” y la actividad de la FX modificada entre las células salvajes y las células modificadas, la actividad de la FX se mide, preferentemente, en condiciones sustancialmente iguales o sustancialmente similares, con una glicoproteína idéntica o sustancialmente idéntica.

Visión general

Se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y proteicas de FX modificadas, donde la modificación tiene como resultado una célula que es incapaz de soportar la fucosilación de las proteínas en ausencia de una fuente externa de fucosa a un nivel en que puede soportar una célula que porta ausencia de la modificación. Las células exhiben una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar glicoproteínas (en ausencia de una fuente de fucosa) a una temperatura debido a una alteración en una actividad enzimática de la ruta de novo para la síntesis del sustrato para la fucosilación de glicoproteínas, GDP-L-fucosa. A otra temperatura (más alta), la reducción en la capacidad de la célula es mínima o insustancial.

La enzima GDP-4-ceto-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) participa en la ruta de novo de la síntesis de la GDP-L-fucosa, formando GDP-L-fucosa a partir de GDP-4-ceto-6-desoximanosa. Una célula puede usar la GDP-L-fucosa resultante para producir proteínas fucosiladas, incluyendo anticuerpos fucosilados. Dado que la GDP-L-fucosa sintetasa participa en la ruta de novo, la reducción de la fucosilación en las células que carecen de suficiente actividad de FX se puede rescatar a través de una ruta salvaje. La ruta salvaje requiere fucosa, sobre la que se actúa a través de la ruta salvaje para formar GDP-L-fucosa, un sustrato para la fucosilación de proteínas.

Determinadas modificaciones en la FX tienen como resultado la incapacidad de una célula que tiene un gen de FX modificado para sostener la fucosilación de las proteínas en ausencia de una fuente de fucosa, de forma que una célula portadora de la enzima modificada y que expresa, por ejemplo, un anticuerpo recombinante, exhibe una reducción sustancial en la capacidad para fucosilar el anticuerpo, en comparación con una célula salvaje portadora del gen de FX salvaje.

La incapacidad para sostener una tasa o nivel suficientes de fucosilación de proteínas debido a las modificaciones del gen de FX descritas en el presente documento depende sustancialmente de la temperatura. En particular, las células portadoras de un gen de FX modificado exhiben una incapacidad sustancial para sostener la fucosilación de glicoproteínas a aproximadamente 37 °C (p. ej., un 7 % de fucosilación de un anticuerpo de isotipo IgG1 humano), que se alivia sustancialmente a aproximadamente 34 °C (p. ej., 70 % de fucosilación del mismo anticuerpo; véase la Tabla 3). Las células que solo tienen un gen de FX salvaje, en contraste no exhiben una gran diferencia en la capacidad para sostener la fucosilación de glicoproteínas a 37 °C en comparación con 34 °C.

Rutas de novo y de rescate a la GDP-fucosa

La GDP-fucosa es un metabolito central en la ruta de la fucosilación de glicoproteínas, es el donante de fucosa en la fucosilación de glicoproteínas. Todas las fucosiltransferasas conocidas de interés que pueden fucosilar una

glicoproteína que comprenden una FC usan GDP-fucosa. Por tanto, para una eficiente fucosilación de las glicoproteínas se debe generar un conjunto suficiente de GDP-fucosa y mantener a un nivel suficiente como para equivaler a la producción de glicoproteína.

5 Existen dos rutas principales a la GDP-fucosa: una ruta de síntesis de novo y una ruta de rescate. En muchas células de mamífero se puede producir una GDP-fucosa a partir de una fuente de carbono suministrada externamente (p. ej., glucosa) mediante una ruta de fucosilación de novo. En la ruta de fucosilación de novo, la glucosa entra en la célula a través de un transportador y se convierte en D-manosa-1-fosfato. La D-manosa-2-fosfato se convierte después a través de la D-manosa-1-fosfato-guanililtransferasa en GDP-manosa. La GDP-manosa se convierte en GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa a través de la GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD). La GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa se convierte en GDP-fucosa a través de la GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX). La GDP-fucosa es un potente inhibidor por retroalimentación de la GMD. La GDP-fucosa entra en el aparato de Golgi a través de un transportador de GDP-fucosa. Una vez en el Golgi, la GDP-fucosa es un sustrato para la α 1,6-fucosiltransferasa, que fucosila glicoproteínas.

15 En muchas células de mamífero también existe una ruta de rescate para generar GDP-fucosa desde fucosa suministrada externamente, En la ruta de rescate, la fucosa se transporta al interior de la célula y se fosforila para formar fucosa-1-fosfato, que se puede convertir en GDP-fucosa. La GDP-fucosa se transporta al Golgi y está disponible como sustrato para la α 1,6-fucosiltransferasa. El transporte de fucosa al interior de la célula probablemente se facilite por difusión y mediante transporte lisosomal y la ruta de rescate parece ser universal en células de mamífero (véase, por ejemplo, Becker y Lowe (2003) *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*, *Glycobiology* 13(7):41 R-53R).

25 Por tanto, en ausencia de una fuente de fucosa, las células fucosilan glicoproteínas usando la fucosa generada por la ruta de síntesis de novo. En presencia de fucosa, las células fucosilan glicoproteínas usando la fucosa transportada al interior de la célula. Por tanto, si la ruta de síntesis de novo se bloquea o daña, la fucosilación de las glicoproteínas puede seguir produciéndose, pero solo en presencia de una fuente de fucosa.

30 Las composiciones y métodos descritos activan las líneas celulares que proporcionen un bloqueo condicional en una ruta para fucosilar una glicoproteína al proporcionar una célula modificada genéticamente que tiene una modificación en una secuencia de ácido nucleico de FX. En las células que contienen tanto la ruta de novo como la de rescate, las células proporcionan una mayor versatilidad. En dichas células, en ausencia de una fuente externa de fucosa, la fucosilación de una glicoproteína puede reducirse sustancialmente a una temperatura, pero no reducirse sustancialmente a una segunda temperatura. Como alternativa, las tasas o niveles de fucosilación de glicoproteínas esencialmente salvajes se pueden activar proporcionando una fuente externa de fucosa con independencia de la temperatura a la cual se mantiene la célula.

Modificaciones de FX

40 Se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia proteica de FX modificada. El ácido nucleico aislado codifica una proteína FX que comprende la modificación de aminoácidos 289S. Por tanto, el ácido nucleico aislado codifica una proteína FX que comprende una serina en la posición 289, en otra realización que comprende al menos uno de 79S, 90K, 136L y/o 211R.

45 El ácido nucleico que codifica la proteína FX modificada se usa en una forma adecuada. La idoneidad de la forma del ácido nucleico depende de su uso. Por ejemplo, formas adecuadas incluyen un ADNc que se puede usar en un vector de expresión para expresión extracromosómica en una célula o que se puede integrar (en una localización específica o aleatoriamente) en un genoma de una célula. Las formas adecuadas también incluyen una secuencia genómica que se modifica para codificar la o las sustituciones descritas en el presente documento. Las formas adecuadas también incluyen, por ejemplo, una secuencia dirigida (p. ej., una o más brazos dirigidos), para dirigir el ácido nucleico a una localización específica en un genoma, por ejemplo para sustituir uno o los dos alelos de un gen de FX nativo. Las formas adecuadas incluyen vectores dirigidos que dirigen el ácido nucleico a una localización específica en una célula por ejemplo en un locus de FX, para sustituir una secuencia de ácido nucleico de FX endógeno por una secuencia de ácido nucleico de FX de acuerdo con la invención. La modificación de una secuencia de FX endógena se puede realizar en uno o los dos alelos de la célula.

Líneas celulares con una fucosilación baja o reducida

60 Se proporcionan composiciones y métodos para líneas celulares de baja fucosilación. Las composiciones incluyen ácidos nucleicos y proteínas que, cuando están presentes en una célula que carece o sustancialmente carece de una actividad de FX nativa o salvaje, confieren a la célula una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína, por ejemplo una glicoproteína que contiene Fc tal como, por ejemplo, un anticuerpo. En varias realizaciones, dichas células incluyen las células que exhiben una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar una glicoproteína a una primera temperatura (p. ej., aproximadamente 37 °C), pero conservan la capacidad para fucosilar la glicoproteína a una segunda proteína (p. ej., aproximadamente 34 °C). Por tanto, se proporcionan células que se pueden cultivar a una primera temperatura que es inhibidora de la fucosilación y las condiciones de crecimiento se

pueden modificar a una segunda temperatura que permite la fucosilación.

Las líneas celulares de baja fucosilación se pueden producir usando cualquier célula adecuada junto con las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, y no a modo de limitación, se puede usar cualquier línea celular de uso habitual en la fabricación de sustancias biofarmacéuticas. Determinados métodos y composiciones para que estas líneas celulares sean útiles como líneas celulares de baja fucosilación se describen en el presente documento; otros son obvios o son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Las células humanas (p. ej., HeLa, PERC.6™, etc.), células CHO, células de ratón etc. se pueden modificar genéticamente como se ha descrito en el presente documento para generar una línea celular útil. En el caso de las células CHO, por ejemplo una línea celular de baja fucosilación útil se puede producir modificando un único alelo del gen de FX debido a la observación de que la actividad de FX en CHO parece ser funcionalmente haploide. En el caso de otras células que exhiben una diploidía funcional en el locus de FX, por otro lado, se puede manipular mediante la sustitución de un alelo de FX por una secuencia de ácido nucleico de FX modificada como se ha descrito en el presente documento e inactivando el segundo alelo (salvaje) o sustituyendo ambos alelos de FX por una secuencia de ácido nucleico de FX modificada como se describe en el presente documento.

Las células resultantes incluyen aquellas cuya actividad de FX se ha caracterizado total o sustancialmente como de baja fucosilación. Es decir, la célula no tiene que estar completamente desprovista de una proteína FX salvaje o un gen de FX salvaje, no obstante, la célula en una condición o conjunto de condiciones adecuadas (p. ej., una determinada temperatura), debería ser incapaz o sustancialmente incapaz de fucosilar una glicoproteína (p. ej., una glicoproteína que contiene FC) en cualquier lugar cerca del nivel que una correspondiente célula con una actividad de FX normal en conjunto puede fucosilar la misma glicoproteína.

La comparación de una célula de acuerdo con la invención y una célula que no contiene la modificación se realiza en las mismas condiciones o esencialmente en las mismas condiciones (p. ej., medio, temperatura, densidad celular etc.). Por ejemplo, en varias realizaciones, la célula exhibirá una capacidad para fucosilar no más del 10 % a no más del 1 % de la capacidad para fucosilar que exhibe una célula salvaje. Esta comparación se puede realizar, por ejemplo, preparando una célula que tiene la o las modificaciones descritas en el presente documento y comparando el nivel de fucosilación de una glicoproteína expresada por la célula (p. ej., expresión de un anticuerpo a partir de una construcción de expresión en la célula) con el nivel de fucosilación de la misma glicoproteína expresada por una célula salvaje. Para la comparación, las células se cultivan a la misma temperatura y en las mismas condiciones. El nivel de fucosilación de la glicoproteína se puede determinar usando cualquier método analítico adecuado conocido en la técnica para cuantificar la cantidad de fucosa presente en una preparación glicoproteica.

Al determinar cuánto de la glicoproteína está fucosilado, la cantidad de fucosa se compara con la cantidad de glicoproteína total o con la cantidad de glicano obtenida de la proteína.

Líneas celulares con fucosilación deficiente

Se ha aislado una serie de líneas celulares de mamífero que en conjunto son incapaces de fucosilar las glicoproteínas. El desarrollo de líneas celulares con fucosilación deficiente ha estado estimulado en gran medida por la necesidad de producir anticuerpos que carezcan de fucosilación. Los anticuerpos que carecen de fucosilación participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mucho mejor que los anticuerpos fucosilados debido a la unión alterada a un receptor de Fc. Por consiguiente, son altamente deseables los anticuerpos que median mejor en la ADCC, en particular los anticuerpos que comprenden regiones variables dirigidos a células tumorales. Por tanto, las células que son incapaces de fucosilar glicoproteínas son ampliamente usadas en el desarrollo y fabricación de anticuerpos para usos terapéuticos.

Se han desarrollado dos defectivas de las rutas de fucosilación que tienen como resultado la incapacidad de una célula para fucosilar una glicoproteína. La inactivación de la α 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) tiene como resultado la incapacidad para transferir GDP-fucosa a una glicoproteína. La inactivación de la GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) tiene como resultado la incapacidad para producir GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa a partir de GDP-manosa en la ruta de novo.

La inactivación de la fucosilación aguas abajo de la formación de GDP-fucosa, por ejemplo deficiencias en la α 1,6-fucosiltransferasa, no puede recurrir a la ruta de rescate para fucosilar las glicoproteínas en presencia de una fuente de fucosa externa. Esto es porque el bloqueo es distal a la formación de GDP-fucosa, el metabolito en el cual se encuentran las rutas de novo y de rescate. Por tanto, alimentar las células que tienen dicha inactivación con fucosa no rescatará la fucosilación de glicoproteínas. Por tanto, las deficiencias en α 1,6-fucosiltransferasa no ofrecen una ruta sencilla para manipular selectivamente la capacidad de una célula para fucosilar una glicoproteína.

La inactivación de la fucosilación aguas arriba de la formación de GDP-fucosa, por ejemplo deficiencias en GDM, puede, en teoría, recurrir a la ruta de rescate para fucosilar glicoproteínas. Esto es porque el bloqueo se produce antes de la formación de GDP-fucosa. Alimentar dichas células con fucosa rescatará, en teoría, la fucosilación de glicoproteínas. No obstante, las líneas celulares que contienen deficiencias carecen de versatilidad.

Los inventores han descubierto que una alteración selectiva de la ruta de fucosilación de novo antes de la formación de GDP-fucosa generará una línea celular con un defecto que es rescatado proporcionando una fuente de fucosa o rescatado manteniendo las células en condiciones que permiten la fucosilación, Los inventores han modificado células para que tengan un defecto en la ruta de novo agudas arriba de la GDP-fucosa y que se pueden cultivar en ausencia de fucosa en na primera condición y exhiben una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar una glicoproteína, mientras que en una segunda condición las células pueden fucosilar con eficiencia una glicoproteína, incluso en ausencia de una fuente de fucosa externa. Una línea celular de este tipo particularmente versátil presenta la opción de encender o apagar la fucosilación en la línea celular controlando la disponibilidad de una fuente externa de fucosa (o un precursor de la fucosa adecuado) y/o cultivando las células en una condición que permite la fucosilación o una condición deficiente en fucosilación.

Los inventores han alterado de forma selectiva la ruta de novo para la síntesis de GDP-fucosa generando una secuencia de ácido nucleico de FX mutada. La proteína FX es una epimerasa-reductasa bifuncional que epimeriza los grupos hidroxilo en C3 y metilo en C5 de la manosa formando GDP-4-ceto-6-desoxigalactosa. Una actividad reductasa dependiente de NADPH de la enzima bifuncional reduce el resto ceto para formar GDP-fucosa. El gen de FX está altamente conservado, que se refleja en los elevados grados de identidad y similitud de las proteínas FX. Véase, per ejemplo, Becker y Lowe (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, *Glycobiology*, 13(7):41 R-53R. Por tanto, los datos presentando en relación con las mutaciones de FX en las células CHO se pueden aplicar a las correspondientes modificaciones de FX en una amplia variedad de células.

La alteración selectiva de FX proporciona una mayor versatilidad, lo que permite a la persona que lo practica desfavorecer, o inhibir, la fucosilación manteniendo un cultivo a una primera temperatura, pero permitir la fucosilación manteniendo el cultivo a una segunda temperatura. En varias realizaciones, esto se ilustra mediante un gen de FX modificado, donde la modificación comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en (para una proteína FX de CHO) L289S, N79S, N90K, P136L, G211R, y una combinación de los mismos, donde al menos L289S está presente. En varias realizaciones, la modificación de FX consiste esencialmente en una modificación seleccionada del grupo que consiste en L289S, L289S/N90K, L289S/G211 R, L289S/P136L, L289S/N79S, y una combinación de los mismos.

Como saben los expertos en la técnica, determinadas células que son diploides exhiben fenotipos que reflejan la actividad de solo uno de dos alelos, en particular loci, por ejemplo células CHO, y con respecto a dichos loci parecen ser funcionalmente haploides (o hipodiploides) desde una perspectiva fenotípica. En dichas células, la modificación de incluso solo un alelo como se describe en el presente documento puede tener como resultado un fenotipo que refleja esencialmente la actividad del alelo modificado, incluso en los casos en los que el fenotipo no es un fenotipo dominante. Por ejemplo, en las células CHO, la modificación como se describe en el presente documento de un solo alelo, probablemente tendrá como resultado un fenotipo FX esencialmente como se describe en el presente documento, probablemente debido a la no expresión (o hipoexpresión) del alelo salvaje de FX.

En varias realizaciones, la FX es una FX que no procede de una célula CHO y la modificación comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación que corresponde en la FX que no es de CHO a las modificaciones de CHO indicadas anteriormente, siempre que la proteína FX sea al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1 y comprenda una serina en la posición 289. Las modificaciones correspondientes se pueden identificar alineando la secuencia de la proteína FZ de CHO con otra secuencia de FX de interés (con o sin huecos en la alineación) usando, por ejemplo, un algoritmo de alineación de la secuencia múltiple de propósito general tal como ClustalW con los parámetros predeterminados (p. ej., para FX humana (N° de acceso AAC50786) y *C. griseus* (N° de acceso AAM91926) usando MacVector™ v. 10.0.2, pareado: Matriz de Gonnet a una velocidad de alineación lenta, penalización por hueco abierto 10,0, penalización por hueco extendido = 0,1; múltiple: Serie de Gonnet, penalización por hueco abierto 10,0, penalización por hueco extendido = 0,2; divergente de retraso = 30 %, distancia de separación de huecos= 4, sin separación de huecos en el extremo, penalizaciones específicas de residuo y penalizaciones hidrofílicas (residuos hidrofílicos GPSNDQEKR)).

Como materia práctica, la alineación de una secuencia sujeto contra la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 1 y 3-6 en MacVector™ usando los parámetros predeterminados de la alineación pareada se identificarán las correspondientes posiciones en la secuencia sujeto a la cual realizar modificaciones en las posiciones equivalentes a las posiciones en CHO N79, N90, P136, G211 y L289.

Glicoproteínas

Las composiciones y métodos se pueden usar para modificar la capacidad de fucosilación de las células para conseguir una baja fucosilación de cualquier glicoproteína de interés. Aunque la mayor parte de esta divulgación hace referencia a las ventajas de la fucosilación reducida en los anticuerpos, los beneficios de la invención no se limitan a los anticuerpos. Cualquier proteína de unión portadora de una Fc, y existen muchos, muchos tipos de dichas proteínas de unión, se puede producir usando las composiciones y métodos de la invención.

Una glicoproteína típica que se puede producir con la invención es un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo humano, de ratón o humanizado) que está glicosilado y, en condiciones normales en una célula salvaje, fucosilado. Ejemplos

incluyen, a modo de ilustración y no a modo de limitación, anticuerpos humanos de los subtipos IgG1, IgG2 e IgG4. Las glicofomas de dichos anticuerpos incluye aquellas con un resto glicano en la posición 298. Glicofomas típicas en la posición 297 incluyen un GlcNAc unido a N, seguido de un GlcNAc, seguido de un resto de trimanosilo biantenal, seguido de (en cada uno de los dos restos de manosilo del resto de trimanosilo biantenal) uno o más
 5 residuos de GlcNAc, seguidos opcionalmente de un residuo de galactosa en uno o más de los residuos de GlcNAc unidos a las antenas del resto de trimanosil biantenal. La fucosilación del glicano normalmente se produce en el residuo de GlcNAc inicial unido a N, donde (normalmente) un único residuo de fucosa está unido a través de una fucosiltransferasa en el anticuerpos glicosilado en 297. En varias realizaciones, la proporción molar o el porcentaje o la extensión de la fucosilación del anticuerpo se mide con respecto a este residuo de fucosa en relación con la
 10 cantidad (o moles) de anticuerpos y/o la cantidad (o moles) de glicano o sustituyente de glicano (p. ej., moles relativos de fucosa:anticuerpo o de fucosa:GlcNAc o fucosa:manosa o fucosa:resto de trimanosilo o fucosa:galactosa del glicano unido a 297, en una preparación de anticuerpos obtenida de células salvajes o de células que comprenden una secuencia de ácido nucleico de FX modificada de acuerdo con la invención).

15 Líneas de CHO con baja fucosilación

Una línea de CHO de baja fucosilación se construyó a partir de células CHO K1 adaptadas a crecer en suspensión en un medio biorreactor sin suero. La línea de CHO (denominada línea 6066) contenía una sustitución L289S en el gen de FX de CHO. En la línea celular y en una línea celular de CHO correspondiente que carece de la modificación
 20 de FX (línea designada 4044) como se describe en los ejemplos se produjeron un anticuerpo recombinante que es una IgG1 humana que se une específicamente a un receptor de interleucina (anticuerpo 1) y un anticuerpo recombinante que es una IgG1 humana que se une específicamente a una proteína de superficie celular de una célula inmunitaria (anticuerpo 2). Las células se cultivaron durante tres días en agitadores o 12 días en un biorreactor (cada uno a 37 °C).

25 Las células portadoras de la modificación en el gen de FX y que expresan el anticuerpo 1 solo fucosilaron aproximadamente un 6,14 o 6,86 % (12 días) o aproximadamente un 7 u 8 % (tres días) del anticuerpo 1, mientras que en ausencia de la modificación de FX, las células fucosilaron aproximadamente un 89,3 % (3 días) o aproximadamente un 85,8 % (12 días) (Tabla 1).

30 Las células portadoras de la modificación del gen de FX y que expresaban el anticuerpo 2 fucosilaban el anticuerpo 2 únicamente en aproximadamente un 3,6 %, mientras que en ausencia de la modificación de FX, las células fucosilaron aproximadamente un 95 % (3 días) o aproximadamente un 76,8 % (12 días) (Tabla 1).

35 A partir de las células CHO K1 que contenían una modificación L289S y N90K del gen de FX en CHO (línea designada 8088) se produjo otra línea CHO de fucosilación baja. El anticuerpo 1 expresado en estas células exhibió únicamente aproximadamente un 0,96 % de fucosilación (3 días) o 0,71 % de fucosilación (12 días) (Tabla 2).

40 Otra línea de CHO de baja fucosilación se produjo a partir de células CHO K1 (de células 6066-1, que tienen una modificación en el gen de FX L289S) que contenían una sustitución P136L (línea designada 2121). Estas células expresaban el anticuerpo 1 que estaba fucosilado solo en un 0,82 % a los 3 días (Tabla 2).

45 Otras dos líneas de CHO de baja fucosilación se produjeron a partir de células CHO K1 (de células 6066-1, que tienen una modificación en el gen de FX L289S) que contenían una sustitución N79S (línea designada 2020 y 6069). Estas células expresaban el anticuerpo 1 que estaba fucosilado solo en un 0,94 % a los 3 días (2020) o solo un 0,86 % fucosilado a los 3 días (6069) (Tabla 2).

50 La dependencia de la temperatura de la fucosilación para el anticuerpo 1 se analizó usando las líneas celulares 4044-1 (sin modificación del gen de FX) y la línea celular 6066-1 (modificación del gen L289S FX). La línea celular 6066-1 solo exhibió un 7 % de fucosilación a 37 °C y aproximadamente un 70 % de fucosilación a 34 °C. La línea celular 4044-1 exhibió aproximadamente la misma fucosilación (95-96 %) tanto a 37 °C como a 34 °C.

55 A partir de la línea celular 8088 (L289S y N90K) que expresaba dos anticuerpos diferentes frente al mismo receptor del factor de crecimiento se produjeron otras dos líneas celulares de fucosilación baja, Ab 3.1 y Ab 3.2. Después de cultivar durante tres días a 37 °C en presencia (ruta de rescate) o en ausencia (ruta de novo) de fucosa se determinó la composición del glicano y el contenido en fucosa del glicano. En ausencia de fucosa, las líneas celulares produjeron solo aproximadamente un 1,87 % o 5,73 % de fucosilación, mientras que en presencia de una fuente externa de fucosa se restauró la fucosilación a al menos un 95,22 % o 95,63 %.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Líneas celulares de CHO

65 En el presente documento se describen diversas líneas celulares de CHO, aisladas directa o indirectamente de células CHO K1.

Células RGC10. La línea celular de CHO 3033 se generó a partir de células CHO K1 como se ha descrito para las células RGC10 en la patente de EE.UU. N° 7.435.553. En resumen, las células CHO K1 se transfectaron de forma estable con los vectores pTE158 y pcDNA6/TR (Invitrogen). Las células transfectadas se seleccionaron según la expresión inducible por doxiciclina de hFcγR1 y se seleccionó un clon para dar lugar a la línea celular 3033. Las células 3033 se adaptaron para crecer en cultivo de suspensión en medio sin suero 3.

Células 5055. Las células 5055 son células CHO K1 que se han adaptado para crecer en suspensión en un medio de biorreactor sin suero Medio 2.

Células 4044. Las células 4044 derivaron de células RGC16 descritas en la publicación de la solicitud de patente internacional n° WO 2008/151219 A1 presentada el 4 de junio de 2008 y la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0124005A1 presentada en 4 de junio de 2008 y que contiene un casete en caja en un locus aumentado de expresión y estabilidad (EESYR). El locus EESYR en 4044 tiene, de 5' a 3' en la hebra de codificación, un sitio loxP, un promotor tardío de SV40, un gen de resistencia a puromicina, un promotor de CMV, un IRES, un gen de eCFP, un sitio lox2272, un promotor de CMV, un gen DsRed y un sitio lox511. Las células 4044 contienen además un vector pcDNA6/TR transfectado de forma estable.

Otras células. La línea celular 7077 derivó de células 3033 sin el uso del ácido nucleico recombinante exógeno. Las líneas celulares 6066, 8088, y 1010 derivaron de células 4044 sin el uso del ácido nucleico recombinante exógeno.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpos recombinantes en células CHO

Vectores. Los vectores descritos en el presente documento tienen las características indicadas, donde la colocación relativa de las características se presentan con respecto a la hebra de codificación, indicadas de 5' a 3'.

pR4000: un promotor UbC humano, un gen que codifica la cadena pesada de Ab 2, un promotor tardío de SV40 y un gen de resistencia a higromicina.

pR4001: un promotor UbC humano, un gen que codifica la cadena ligera de Ab 2, un promotor tardío de SV40 y un gen de resistencia a puromicina.

pR4002: un sitio LoxP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena pesada de Ab 2, un promotor tardío de SV40 y un sitio Lox2272.

pR4003: un sitio Lox2272, un gen de resistencia a higromicina, un IRES, un gen de EGFP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena ligera de Ab 2 y un sitio Lox511.

pR4004: un promotor tardío de SV40 y el gen que codifica la recombinasa Cre (véase el documento WO 2008/151219A1).

pR4005: un sitio LoxP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena ligera del anticuerpo 1 (Ab 1), un promotor tardío de SV40 y un sitio Lox2272.

pR4006: un sitio Lox2272, un gen de resistencia a higromicina, un IRES, un gen de EGFP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena pesada de Ab 1 y un sitio Lox511.

pR4007: un sitio LoxP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena ligera de Ab 1, un promotor tardío de SV40, un gen que codifica el extremo N de la proteína de resistencia a higromicina y un sitio Lox2272.

pR4008: un sitio Lox2272, un gen que codifica el extremo C de la proteína de resistencia a higromicina, un IRES, un gen de EGFP, un promotor de CMV humano, un gen que codifica la cadena pesada de Ab 1 y un sitio Lox511.

pR4009: un sitio LoxP, un promotor tardío de SV40, un gen de resistencia a higromicina, un sitio interno de entrada para el ribosoma (IRES), un gen de EGFP, un promotor de CMV humano y un sitio Lox511.

pR4010: un sitio LoxP, un promotor tardío de SV40, un gen de resistencia a higromicina, un IRES, un gen de EGFP, un promotor de CMV humano, el gen de FX salvaje y un sitio Lox511.

pR4010: un sitio LoxP, un promotor tardío de SV40, un gen de resistencia a higromicina, un IRES, un gen de EGFP, un promotor de CMV humano y el gen de FX mutado que tiene las mutaciones el gen L289S y N90K.

La competencia de la fucosilación en las células CHO se estudió mediante tinción LCA de superficie celular y mediante análisis de los anticuerpos recombinantes producidos por las células CHO. En un estudio, se usaron células 7077 como las células huésped para la expresión del anticuerpo 2 (Ab 2), un anticuerpo IgG1 humano contra un receptor de células B humanas, seguido de un método descrito en la patente de EE.UU. N° 7.435.553. En pocas palabras, las 1×10^7 células 7077 se transfectaron con el plásmido pR4000 (cadena pesada, resistencia a

higromicina) y pR4001 (cadena ligera, resistencia a puromicina) usando Lipofectamine™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos transfectados se seleccionaron con 400 microgramos/ml de higromicina y 10 microgramos/ml de puromicina cada uno durante dos semanas en medio F12 que contiene 10 % de suero bovino fetal. Las células que sobrevivieron a la selección se combinaron y se adaptaron para cultivar en suspensión en un medio de biorreactor sin suero Medio 2. La expresión de hFcγRI se indujo mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo durante tres días. Los cultivos inducidos se incubaron con 1 miligramo/ml de IgG de conejo durante 18 horas antes de la tinción con el fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo Fc anti-humano conjugado con FITC policlonal de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Las células se tiñeron durante 1 hora, después se lavaron dos veces con PBS antes del análisis mediante citometría de flujo en un clasificador celular MoFlo™ (Fort Collins, CO). Las células con una intensidad media de fluorescencia FITC en el 5% superior de la población celular total se clasificaron en un grupo y se denominaron células 7077-1. Las células 7077-1 se expandieron durante 10 días en el Medio 2. Para producir Ab 2, recombinante, las células 7077-1 se sembraron a 4 x 10⁵ células/ml de medio 2 en un matraz agitador a 37 °C. Tres días después, el medio acondicionado se recogió y la proteína Ab2 se purificó mediante cromatografía de afinidad de la Proteína A.

Se usaron células CHO4044 y 6066 como células huésped para la expresión de Ab 2 y Ab 1, un anticuerpo IgG1 humano contra un receptor de citoquina humana. En pocas palabras, para expresar Ab 2, 2 x 10⁶ células 4044 y 2 x 10⁶ células 6066 (teniendo cada uno un casete lox en un locus EESYR) se transfectaron cada uno con pR4002 (cadena pesada en un casete lox), pR4003 (cadena ligera y resistencia a higromicina en un casete lox) y pR4004 (codifica Cre). Para expresar Ab 1, 2 x 10⁶ células 4044 y 2 x 10⁶ células 6066 se transfectaron cada una con pR4005 (cadena ligera en un casete lox), pR4006 (cadena pesada y resistencia a higromicina en un casete lox) y pR4004 (codifica Cre). Las células 4044 y 6066 transfectadas se seleccionaron con 400 microgramos/ml de higromicina durante 10 días en medio F12 que contiene 10 % de FCS. Las células supervivientes se adaptaron para crecer en suspensión en medio sin suero 1 durante siete días. Las células que han sufrido un intercambio de casete mediado por Cre en el locus EESYR expresaron EGFP pero no DsRed o ECFP. Las células positivas para EGFP pero negativas para DsRed y ECFP se recolectaron mediante clasificación celular usando un clasificador MoFlo™. Las células derivadas de 4044 transfectadas con los genes Ab 2 y Ab 1 se designaron células 4044-2 y 4044-1, respectivamente. Las células derivadas de 6066 transfectadas con los genes Ab 2 y Ab 1 se designaron células 6066-2 y 6066-1, respectivamente. Las células 4044-2, 6066-2, 4044-1, y 6066-1 se expandieron cultivando en medio 2 durante siete años. Para producir anticuerpos recombinantes, las cuatro líneas celulares se sembraron a 4 x 10⁵ células/ml de medio 2 en un matraz de agitación a 37 °C. Tres días después, los medios acondicionados se recogieron y los anticuerpos recombinantes en los mismos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Las células CHO 8088 y 1010 CHO también se usaron como células huésped para la expresión de Ab 1. En pocas palabras, para expresar Ab 1, 2 x 10⁶ células 8088 y 2 x 10⁶ células 1010 se transfectaron cada una con pR4007 (cadena ligera y primera porción del gen de resistencia a higromicina en un casete lox), pR4008 (cadena pesada y segunda porción del gen de resistencia a higromicina en un casete lox) y pR4004 (que codifica Cre). Las células transfectadas que sobrevivieron a la selección con 400 microgramos/ml de higromicina se adaptaron para crecer en suspensión en medio sin suero 1. Las células que expresaron EGFP pero no DsRed o ECFP de las células 8088 y 1010 transfectadas se aislaron clasificando las células en un MoFlo™ y se designaron 8088-1 y 1010-1. Para producir la proteína Ab 1, las células 8088-1 y 1010-1 se sembraron en matraces de agitación a 4 x 10⁵ células/ml. Tres días después, los medios de cultivo se recogieron y el Ab 1 en ellos se purificaron mediante cromatografía de proteína A.

Ejemplo 3: Análisis de fucosilación del anticuerpo

Las proteínas anticuerpo IgG1 humanas purificadas se desglucosilaron inicialmente con PNGasa F en condiciones desnaturalizadas (0,5 % de SDS, TCEP 2mM y bloqueo con 1 % de NP-40) en Tris 50 mM a pH 8,0 con una proporción proteína/enzima de 1 microgramo/0,1 mU a 37 °C durante la noche. Los glicanos liberados se derivaron de forma fluorescente con ácido antranílico a 80 °C durante 1 hora. Las muestras se limpiaron previamente para eliminar el exceso de reactivo de ácido antranílico con cartuchos de Waters Oasis™ HLB. La mezcla de oligosacáridos se analizó después mediante HPLC de fase inversa usando 0,5 % de TFA en ddH₂O como fase móvil A y 0,045 % de TFA en 90 % de acetonitrilo/10 % de ddH₂O como la fase móvil B. Los glicanos se resolvieron en una columna Thermo Hypercarb™ (Thermo Fisher, Waltham, MA) (dimensión de 100 x 2,1, de tamaño de partícula de 3 micrómetros) mediante la aplicación de un gradiente de 30 a 40 % B durante 40 minutos. Las señales se detectaron usando un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y una longitud de onda de emisión de 425 nm. Análisis adicionales de los picos de glicano separados mediante HPLC mediante espectrometría de masas revelaron que se separaban en dos grupos principales: glicanos biantenales no fucosilados y glicanos biantenales fucosilados. Dentro de cada grupo (fucosilados frente a no fucosilados), los glicanos se separaron adicionalmente en las formas digalactosil (G2), monogalactosil (G1) o agalactosil (G0). La integración del área del pico correspondiente a diferentes formas de glicano permite la cuantificación sobre las poblaciones de cada glicano individual sobre el anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 4: Secuenciación de los transcritos mayoritarios de los genes de FX, GMD, transportador de GDP-fucosa y FUT8

- Las proteínas codificadas por los genes de de FX, GMD, transportador de GDP-fucosa y FUT8 son componentes de la ruta de fucosilación de novo. Se determinaron las secuencias del transcrito mayoritario del gen de FX en las líneas de células CHO 5055, 4044-1, 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010, y 8088 y las secuencias del transcrito mayoritario del gen de GMD en las células 4044-1, 6066-1, 1010, y 8088. También se determinaron las secuencias de los transcritos mayoritarios del gen de FUT8 y transportador de GDP-fucosa en células 4044-1 y 6066-1.
- En pocas palabras, el ARN total se aisló de 5×10^6 células CHO usando el kit Micro-Fast Track 2.0 Kit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ADNc de los cuatro genes de fucosilación se sintetizaron a partir de ARN total usando oligo-gT como cenador y SuperScript III First-Strand Synthesis System™ (Invitrogen). El ADNc de GMD se amplificó mediante PCR usando los cebadores 5'-ctacaatctt ggtgccaga gc-3' SEC ID Nº 7 y 5'-tccagttcag tttctgctgc g-3' SEC ID Nº 8. El ADNc de FX se amplificó mediante PCR usando los cebadores 5'-ttcctgaca agaccaccta tcc-3' SEC ID Nº 9 y 5'-tagttgctgg tgaaccaggc ac-3' SEC ID Nº 10. El ADNc del transportador de la GDP-fucosa se amplificó mediante PCR usando los cebadores 5'-gatgaggaca gcaggaaca gc-3' SEC ID Nº 11 y 5'-agcactcttc tcaccctctt tgg-3' SEC ID Nº 12. El ADNc de FUT8 se amplificó mediante PCR usando los cebadores 5'- agccaagggt aagtaaggag gacg-3' SEC ID Nº 13 y 5'-ttgtagacag cctccatctt cg-3' SEC ID Nº 14. Las ADN polimerasas usadas en las reacciones de PCR fueron una mezcla de 20 a 1 de Platinum Taq™ (Invitrogen) y Pfu clonado (Stratagene, La Jolla, CA). Los productos de la PCR se purificaron mediante electroforesis en gel y se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de ADN clonados se transformaron en células DH10B electrocompetentes. Se escogió un mínimo de tres colonias bacterianas para cada transformación con el fin de inocular tres cultivos líquidos que contenían LB y 100 microgramos/ml de ampicilina. Los ADN de plásmidos en estos cultivos se purificaron usando QIAprep Spin Miniprep Kit™ (Qiagen). Las secuencias de los productos de PCR clonados se determinaron usando los cebadores M13 localizados en el vector y los respectivos cebadores para PCR 5' y 3'. Estas secuencias se compararon con las secuencias en Genbank para el ARNm de FX (número de acceso AF525365), GMD (número de acceso AF525364), transportador de la GDP-fucosa (número de acceso AB222037), y FUT8 (número de acceso BD359138) de C. griseus.
- Las mutaciones en las secuencias consenso del transcrito de FX que dieron lugar a cambios de codones con respecto a la secuencia de referencia en Genbank (AF525365) se identificaron en las células in 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010 y 8088 (Tablas 1 y 2). Las secuencias de los transcrito de GMD de las células 4044-1, 6066-1, 1010 y 8088 coincidían con las secuencias de GMD indicadas en GenBank (número de acceso AF525364). Las secuencias de los transcritos del transportado de la GDP-fucosa y de FUT8 en las células 4044-1 y 6066-1 coincidían con sus respectivas secuencias indicadas en GenBank también (números de acceso AB222037 y BD359138).

Ejemplo 5: Fucosilación en las líneas celulares CHO con una única mutación L289S en el gen de FX

- Primero se estudió la competencia en cuanto a la fucosilación relativa en las células 3033, 4044, 6066 y 7077 mediante tinción de las células con la lectina Lens culinaris aglutinina (LCA). En pocas palabras, 2×10^6 células 4044 y 6066 se incubaron cada una con biotina-LCA (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a 5 microgramos/ml durante una hora. Tras dos lavados con PBS, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos. Después, las células se llevaron una vez con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células 3033 y las células 7077 se tiñeron con FITC-LCA durante una hora, se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo (FIG. 2). Las células 3033, 4044, 6066 y 7077 se tiñeron todas con LCA. La intensidad de la tinción con LCA en las células 6066 y 7077 fue significativamente más débil que la intensidad de la tinción con LCA en las células 3033 y 4044 (FIG. 2), lo que sugiere que había menos fucosilación de proteínas en las células 6066 y 7077 que en las células 3033 y 4044. Para analizar su las células 6066 y 7077 podían usarse como células huésped para la expresión de los anticuerpos hlgG1 con un contenido en fucosa bajo, las células 4044 y 6066 se transfectaron de forma estable con los plásmidos de expresión para Ab 2 y Ab 1, y las células 7077 se transfectaron de forma estable con los plásmidos de expresión para Ab 2 (véase el Ejemplo 2). Ab 2 y Ab 1 recombinantes se produjeron a partir de las células transfectadas en cultivos en matraces de agitación durante tres días, así como en cultivos en biorreactor de forma discontinua durante doce días. Ab 2 y Ab 1 se purificaron a partir del medio acondicionado y los niveles de su fucosilación se determinaron mediante HPLC (Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 1, 7077-1, 6066-1, y 6066-2 produjeron anticuerpos recombinantes con un nivel de fucosilación entre 3,6 % y 8 % en agitadores y biorreactores a 37 °C.

Designación de la línea celular huésped	Designación de la línea celular de producción	Mutación consenso en FX	Anticuerpo indicador	Fucosilación en agitador (%)	Fucosilación en biorreactor (%)
4044	4044-1	Ninguna	Ab 1	89,3	85,8
7077	7077-1	L289S	Ab 2	4,0	

Designación de la línea celular huésped	Designación de la línea celular de producción	Mutación consenso en FX	Anticuerpo indicador	Fucosilación en agitador (%)	Fucosilación en biorreactor (%)
4044	4044-2	Ninguno	Ab 2	95	76,8
6066	6066-1	L289S	Ab 1	7; 8	6,14; 6,86
6066	6066-2	L289S	Ab 2	3,6	

Ejemplo 6: Fucosilación en las líneas celulares CHO con dos mutaciones de aminoácidos en el gen de FX

8088, y 1010 son dos líneas celulares aisladas de las células 6066 sin el uso del ácido nucleico recombinante exógeno. 6069, 2020 y 2121 son tres líneas celulares aisladas de las células 6066-1 sin el uso del ácido nucleico recombinante exógeno. Las secuencias del transcrito mayoritario para el gen de FX se determinaron mediante RT-PCR (Tabla 2). Se encontró que estas cinco líneas celulares tenían la misma mutación L289S en las células 6066 y 7077. Los transcritos de FX en las cinco líneas celulares también portan mutaciones que cambian un aminoácido además del cambio L289S. Estas mutaciones se resumen en la Tabla 2. Las células 8088, 1010, 6069, 2020 y 2121 exhibieron una unión reducida a LCA (FIG. 4), lo que sugiere una fucosilación de proteínas reducida en estas células.

Para examinar la competencia de la fucosilación en las células 8088 y 1010 se produjo Ab 1 en estas dos células huésped mediante transfección estable. Los cultivos transfectados se seleccionaron con 400 microgramos/ml de higromicina durante dos semanas. Las células resistentes a higromicina se adaptaron para cultivar en el medio 1 en cultivos en suspensión. El Ab 1 recombinante se produjo en cultivos en matraces de agitación durante tres días, así como en cultivos en biorreactor de alimentación discontinua durante doce días. Ab 1 se purificó a partir del medio acondicionado y los niveles de fucosilación de Ab 1 se determinaron mediante HPLC (Tabla 2). Como se muestra en la Tabla 2, las células 8088 y 1010 transfectadas produjeron el anticuerpo Ab 1 recombinante con un nivel de fucosilación entre 0,53 % y 0,96 % en agitadores y biorreactores a 34 °C.

La competencia en fucosilación en las células 6069, 2020, 2121 también se analizó tras la purificación de la proteína Ab 1 producida en cultivos en matraces de agitación. La Tabla 2 muestra que estas tres líneas celulares produjeron Ab 1 con niveles de fucosilación variables desde 0,82 % a 0,94 %.

Designación de la línea celular huésped	Designación de la línea celular de producción	Mutación de FX	Proteína indicadora	Fucosilación en agitador (%)	Fucosilación en biorreactor (%)
8088 (8088)	8088-1	L289S, N90K	Ab 1	0,96	0,71
1010	1010-1	L289S, G211 R	Ab 1	0,94	0,53
	2121	L289S, P136L	Ab 1	0,82	
	2020	L289S, N79S	Ab 1	0,94	
	6069	L289S, N79S	Ab 1	0,87	

Ejemplo 7: Competencia de la fucosilación en 6066-1 depende de la temperatura

El efecto de las temperaturas de cultivo en la fucosilación de proteínas en las células 6066-1 se analizó mediante tinción con LCA y mediante análisis de la fucosilación de la proteína Ab 1 producida en estas células. La FIG. 5 mostró las tinciones con LCA de las células 4044-1 Y 6066-1 cultivadas a 37 °C y a 34 °C. Las células 4044-1 cultivadas a 34 °C y a 37 °C se tñeron de forma similar mediante LCA. Las células 6066-1 cultivadas a 34 °C se unieron a LCA a un nivel que era significativamente mejor que el de las células 6066-1 cultivadas a 37 °C. En la tabla 3 se muestra el nivel de fucosilación en la proteína Ab1 producida en las células 4044-1 y 6066-1 en los cultivos en matraces de agitación a 34 °C y a 37 °C. Las células 4044-1 produjeron Ab 1 con una fucosilación del 96 % y 95 % cuando se cultivaron a 34 °C y a 37 °C, respectivamente. Por el contrario, las células 6066-1 produjeron Ab 1 con una fucosilación de aproximadamente 70 % y 7 % a 34 °C y a 36 °C, respectivamente. Este resultado indica que el nivel de fucosilación en las células 6066-1 depende de la temperatura.

Designación de la línea celular de producción	Mutación consenso en FX	Temp. de cultivo (°C)	Fucosilación en Ab 1 (%)
4044-1	Ninguna	37	95

Tabla 3			
Designación de la línea celular de producción	Mutación consenso en FX	Temp. de cultivo (°C)	Fucosilación en Ab 1 (%)
4044-1	Ninguna	34	96
6066-1	L289S	37	7
6066-1	L289S	34	70

Ejemplo 8: Fucosilación de las células CHO cultivadas en medio suplementado con L-fucosa

En células de mamífero se puede producir GDP-fucosa mediante la ruta de síntesis de novo y la ruta de rescate (Becker y Lowe (2003) *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*, *Glycobiology* 13(7):41 R-53R). En las células cultivadas en medio de cultivo sin L-fucosa, se produce GDP-fucosa mediante las proteínas GMD y FX a partir de GDP-manosa. En el medio con L-fucosa, se puede generar GDP-fucosa a partir de L-fucosa a través de la L-fucosa quinasa y la GDP-L-fucosa pirofosforilasa. La GDP-fucosa producida por cualquiera de las rutas es transportada al aparato de Golgi mediante el transportador de GDP-fucosa. En el aparato de Golgi, la proteína fucosiltransferasa FUT8 convierte la glicoproteína en proteínas fucosiladas con GDP-fucosa. Se analizó la competencia de la fucosilación de las células 6066-2, 8088 y 1010 cultivadas en medios de cultivo con y sin L-fucosa 5 mM. Las células 6066-2 expresaron el anticuerpo Ab 2 y portaban la mutación L289S en los transcritos del gen de FX (Ejemplo 2 y Tabla 1). Mediante análisis HPLC del Ab 2 purificado, las células 6066-2 cultivadas en matraces de agitación produjeron AB 2 con una fucosilación del 1,9 % en medio 2 sin L-fucosa añadida. Por el contrario, las células 6066-2 cultivadas en matraces de agitación produjeron Ab 2 con una fucosilación del 93,5 % en medio 2 suplementado con L-fucosa 5 mM. Este resultado indica que la ruta de rescate para la síntesis de GDP-fucosa, el transportador de la GDP-fucosa y la proteína FUT8 fueron funcionales en las células 6066-2.

Las competencias relativas de la fucosilación de las células 3033, 5055, 7077, 8088 y 8088 cultivadas en medio 2 con y sin L-fucosa 5 mM se analizaron mediante tinción con LCA (FIG. 6). Las células 3033 y 5055 se unieron a niveles similares de LCA con y sin suplemento con L-fucosa. Las células 7077, 8088, y 8088 se unieron significativamente más a LCA cuando se cultivaron en medio con L-fucosa 5 mM que en los medios que carecen de L-fucosa. Este resultado sugiere que las células 7077, 8088, y 8088 tenían el transportador de GDP-fucosa funcional y la proteína FUT8 funcional.

Ejemplo 9: Fucosilación en 8088 transfectadas con el gen de FX

Para confirmar que el nivel de fucosilación reducido observado en las células 8088 se debía al gen de FX mutante (con las mutaciones L289S Y N90K), el gen de FX salvaje y el gen de FX mutante se expresaron en células 088 mediante transfección estable y después se estudió la competencia en la fucosilación de las células transfectadas mediante tinción de las células con LCA. Como control, las células 8088 se transfectaron por separado con el vector pR4009 (casete lox que tiene el gen de resistencia a higromicina y el gen de EGFP). Los vectores pR4010 y pR4011 contienen el gen de FX salvaje y el gen de FX L289S N90K localizado entre el promotor de CMV y el sitio Lox511 en pR4009, respectivamente. Las células 8088 transfectadas con pR4004 y o pR4009, pR4010, o pR4011 se seleccionaron con 400 microgramos/ml de higromicina durante 14 días. Las células sometidas a intercambio de casete mediado por Cre en EESYR expresaron EGFP pero no EYFP. Las células que eran positivas para EGFP pero negativas para EYFP se aislaron mediante clasificación celular. Tras la expansión en cultivo tisular a 34 °C, las células clasificadas se tiñeron secuencialmente con biotina-LCA y PE-estreptavidina. Las células 8088 transfectadas con los vectores pR4009 Y pR4011 exhibieron el mismo nivel de tinción con LCA. Por el contrario, las células 8088 transfectadas con pR4010 exhibieron un nivel de tinción de LCA comparable a las células 5055 (FIG. 7). En resumen, la proteína FX salvaje, pero no la proteína FC mutante de L289S N90K, pudo restablecer el nivel de fucosilación en las células 8088 tal como se analiza mediante tinción con LCA. Este resultado indica que el nivel de fucosilación menor en la célula 8088 se debía a la mutación L289S N90K en la proteína FX en estas células.

Ejemplo 10: HPLC y espectrometría de masas de glicanos: Ab 3.1 y 3.2

Línea celular 8088, la línea de CHO que tiene la modificación en el gen de FX que codifica una sustitución en la proteína FX L289S y N90K, se transfectó por separado con plásmidos que codifican las cadenas pesada (IgG1 humana) y ligera (kappa humana) de dos anticuerpos humanos con diferentes regiones variables que se unen específicamente al mismo receptor del factor de crecimiento (Anticuerpo 3.1 y anticuerpo 3.2). Las células que expresan el anticuerpo se cultivaron en medio 2 en presencia y en ausencia de fucosa 10 mM durante 3 días a 37 °C y los glucanos de los anticuerpos en cada conjunto de las condiciones se aislaron e identificaron mediante espectroscopia de masas.

Las células 8088 que expresan A3.1 en presencia de fucosa produjeron tres picos principales de glicano en la HPLC (FIG. 8) que representan tres glicanos no fucosilados diferentes en un espectro de masas que difirió en la galactosilación terminal (FIG. 9) con una fucosilación de aproximadamente 1,47 %. Las células 8088 que expresan A3.1 en presencia de fucosa 10 mM produjeron tres picos principales de glicano en la HPLC (FIG. 10), que

representan tres gLicanos fucosilados diferentes y un glicano no fucosilado en un espectro de masas (FIG. 11) con una fucosilación de aproximadamente 95,22 %.

Las células 8088 que expresan A3.2 en presencia de fucosa produjeron tres picos principales de glicano en la HPLC (FIG. 12) que representan tres glicanos no fucosilados diferentes en un espectro de masas que difirió en la galactosilación terminal (FIG. 13) con una fucosilación de aproximadamente 5,73 % %. Las células 8088 que expresan A3.2 en presencia de fucosa 10 mM produjeron tres picos principales de glicano en la HPLC (FIG. 14), que representan tres gLicanos fucosilados diferentes y una cuarta cantidad minoritaria de glicano no fucosilado en un espectro de masas (FIG. 15) con una fucosilación de aproximadamente 95,63 %.

Los resultados del análisis de glicano para células 8088 alimentadas con fucosa y no alimentadas con fucosa que expresan el anticuerpo 3.1 o el anticuerpo 3.2 se resumen en la FIG. 16, agrupados de acuerdo con el tipo de glicano. Las columnas que indican el porcentaje de anticuerpos en una condición concreta suman 100. Para Ab 3.1, la fucosilación total en ausencia de fucosa 10 mM fue 1,87 %; para Ab 3.2, la fucosilación total en ausencia de fucosa 10 mM fue 5,73 % (suma correspondiente a las columnas en las últimas tres filas de la tabla de la FIG. 16). En presencia de fucosa 10 mM, la fucosilación total para Ab 3.1 fue del 95,22 %; en presencia de fucosa 10 mM, la fucosilación total para Ab 3.2 fue del 95,63 % (suma las correspondientes columnas en las últimas tres filas de la tabla de la FIG. 16). Estos datos establecen que las líneas celulares de baja fucosilación fucosilan no más de aproximadamente 1,87 % o 5,73 % en ausencia de fucosa, pero dicha fucosilación se puede recuperar en presencia de fucosa hasta al menos aproximadamente un 95,22 % o 95,63 % de fucosilación.

Para el análisis de glicano, alícuotas de 100 microgramos de cada uno de las dos muestras de anticuerpos (anticuerpo 3.1 y el anticuerpo 3.2) se resuspendieron en 45 microlitros de tampón de desnaturalización que contenía Tris 50 mM (pH 8,0), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 2,0 mM, 0,5% de SDS. La proteína se desnaturalizó calentando a 80 °C durante 7 minutos. Los glicanos unidos a N en el anticuerpo se liberaron tras incubación con 10 mU de PNGasa F y 1 % de NP40 a 37 ° C durante la noche. Los glicanos liberados se marcaron con fluorescencia mediante la adición de 2000 microlitros de solución de derivación (30 mg/ml de ácido antranílico (AA) y 20 mg/ml de cianoborohidruro sódico en metanol que contiene 4 % (peso/volumen) de acetato sódico y 2 (peso/volumen) de ácido bórico) e incubación a 80 °c durante 1 hora. Los glicanos derivados de AA se separaron además de los reactivos en exceso usando un cartucho de extracción en fase sólida (Oasis™ HLB cartridge, Waters Corp.) y eluyeron en 200 microlitros de 5 % de acetonitrilo. Para la separación mediante HPLC de los glicanos se usó una columna Thermo Hypercarb™ (3 µm, 100 x 2,1 mm) a un caudal de 0,15 ml/min. La fase móvil A fue 0,05 % de TFA en H₂O, y la fase móvil B 0,045 % de TFA en 90 % de acetonitrilo y 10 % de H₂O. Un alícuota de 10 microlitros de oligosacáridos derivados fluorescentes se mezcló con 90 microlitros de 0,1 % de TFA en H₂O y se inyectó en la columna preequilibrada en 25 % de la fase móvil B. Después de la inyección de la muestra se incrementó el gradiente a 30 % de B en 5 minutos, seguido de otro incremento a 43 % de B en 39 minutos para separar el oligosacárido. Los glicanos marcados con AA se detectaron usando un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. El análisis de espectrometría de masas de los glicanos marcados con AA se realizó usando un sistema Shimadzu Axima™ MALDI-TOF. Cien microlitros de los glicanos derivados se secaron en vacío Speed y se resuspendieron en 10 microlitros de 0,1 % de TFA. Los glicanos concentrados se desalaron además usando Nutip Hypercarb™ y eluyeron en 30 microlitros de 0,1 % de TDA en 65 % de acetonitrilo y se secaron en Speed Vac. Los glicanos liofilizados se redisolviaron en 2 microlitros de DHB 10 MG/ML (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) en 70 % de acetonitrilo y se pasaron a la placa de MALDI. Los espectros se recogieron en modo negativo lineal, con extracción posterior a 1.5000 mu y potencia de láser fijada entre 60-90 % de la potencia máxima (6 mW) a una longitud de onda de 337 nm.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Células de fucosilación deficiente

<130> 0851-WO

<140> A asignar

<141> Archivado en este documento

<150> 61/183.400

<151> 02-06-2009

<150> 61/348.858

<151> 27-05-2010

<160> 14

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

ES 2 527 173 T3

<210> 1
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*

5

<400> 1

```

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1          5          10          15
Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
          20          25          30
Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
          35          40          45
Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
          50          55          60
His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65          70          75          80
Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
          85          90          95
Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
          100          105          110
Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
          115          120          125
Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
          130          135          140
Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145          150          155          160
His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
          165          170          175
His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
          180          185          190
His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
          195          200          205
Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
          210          215          220
Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225          230          235          240
Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
          245          250          255
Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
          260          265          270
Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
          275          280          285
Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
          290          295          300
Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
305          310          315          320
Lys
    
```

10 <210> 2
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 2

ES 2 527 173 T3

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 . 5 10 15
 Gly Leu Val Gly Lys Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Pro Gly Glu Asp Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45
 Thr Asp Ala Ala Gln Thr Arg Ala Leu Phe Glu Lys Val Arg Pro Thr
 50 55 60
 His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95
 Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Cys Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110
 Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125
 Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140
 Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160
 Tyr Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175
 His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205
 Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220
 Gln Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe His Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270
 Thr Ser Lys Ser Asp Gly Gln Phe Lys Lys Thr Ala Ser Asn Ser Lys
 275 280 285
 Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320
 Lys

<210> 4
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 527 173 T3

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Gly Lys Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Pro Gly Glu Asp Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45
 Thr Asp Thr Ala Gln Thr Arg Ala Leu Phe Glu Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60
 His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Met Asn Asp Asn
 85 90 95
 Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110
 Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125
 Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Asn Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140
 Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160
 Tyr Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175
 His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205
 Gly Thr Gly Asn Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220
 Gln Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe His Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270
 Thr Thr Lys Ser Asp Gly Gln Phe Lys Lys Thr Ala Ser Asn Ser Lys
 275 280 285
 Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320
 Lys

<210> 5
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 5

ES 2 527 173 T3

Met Gly Glu Pro His Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45
 Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60
 His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95
 Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110
 Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125
 Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140
 Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160
 His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175
 Tyr Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205
 Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Ser Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Asn Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285
 Leu Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300
 Val Lys Glu Thr Cys Thr Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320
 Lys

<210> 6
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 6

ES 2 527 173 T3

Met Gly Glu Pro His Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45
 Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60
 His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95
 Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110
 Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125
 Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140
 Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160
 His Gly Cys Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

Tyr Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205
 Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Ser Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285
 Leu Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Phe Cys Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Glu Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320
 Lys

5 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 7
 ctacaatctt ggtgccaga gc 22

15 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética
 <400> 8
 tccagttcag ttctgctgc g 21
 5
 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> sintética
 <400> 9
 ttccctgaca agaccaccta tcc 23
 15
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> sintética
 <400> 10
 tagtgtcgg tgaaccaggc ac 22
 25
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 <400> 11
 gatgaggaca gcaggaacaa gc 22
 35
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética
 <400> 12
 agcactcttc tcaccctctt tgg 23
 45
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintética
 <400> 13
 agccaagggt aagtaaggag gacg 24
 60
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 527 173 T3

<220>

<223> sintética

<400> 14

5 ttgtagacag cctccatcct cg 22

REIVINDICACIONES

1. Una célula que es capaz de fucosilar una glicoproteína, donde la célula comprende un gen de la GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) modificada que tiene una modificación que codifica una proteína FX que es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1 y que comprende una serina en la posición 289, y donde no más del 10 % de la glicoproteína está fucosilada cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa.
2. La célula de la reivindicación 1, donde el gen de FX comprende además una modificación que codifica una proteína FX que tiene un aminoácido en una posición específica seleccionada del grupo que consiste en una serina en la posición 79, una lisina en la posición 90, una leucina en la posición 136, una arginina en la posición 211 y una combinación de los mismos.
3. La célula de la reivindicación 1, donde:
- (a) la proteína FX es al menos un 95 % idéntica a la SEC ID N° 1 y comprenden una serina en la posición 289;
 - (b) la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO); o
 - (c) la proteína FX es una proteína de hámster, ratón, rata, mono o ser humano.
4. La célula de la reivindicación 1, donde la célula expresa una glicoproteína que comprende una región CH2 de inmunoglobulina y una región CH3 de inmunoglobulina.
5. La célula de la reivindicación 4, donde la glicoproteína es un anticuerpo.
6. La célula de la reivindicación 4, donde la no más del 6 % de la glicoproteína está fucosilado cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en ausencia de una fuente externa de fucosa.
7. La célula de la reivindicación 6, donde la no más del 2 % de la glicoproteína está fucosilado cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en ausencia de una fuente externa de fucosa.
8. La célula de la reivindicación 1, donde la célula fucosila:
- (a) al menos un 70 % de la glicoproteína cuando la célula se cultiva a una temperatura de 34 °C en ausencia de una fuente externa de fucosa; o
 - (b) al menos un 90 % de la glicoproteína cuando la célula se cultiva a una temperatura de 34 °C en ausencia de una fuente externa de fucosa.
9. La célula de la reivindicación 1, donde la célula fucosila:
- (a) al menos un 70 % de la glicoproteína cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en presencia de una fuente externa de fucosa; o
 - (b) al menos un 90 % de la glicoproteína cuando la célula se cultiva a una temperatura de 37 °C en presencia de una fuente externa de fucosa.
10. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína FX, donde la proteína FX comprende una serina en la posición 289 y donde la proteína FX es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1.
11. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 10, donde:
- (a) la proteína FX codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende además una serina en la posición 79 o una lisina en la posición 90 o una leucina en la posición 136 o una arginina en la posición 211 o una combinación de los mismos; o
 - (b) la proteína FX codificada por la secuencia de nucleótidos es al menos un 95 % idéntica a la SEC ID N° 1.
12. La célula de la reivindicación 1, que además comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de inmunoglobulina.
13. Un método para producir una glicoproteína con fucosilación reducida, que comprende:
- cultivar una célula de mamífero que comprende un gen de FC que codifica una proteína FX con una serina en la posición 289 y donde la proteína FX es al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N° 1, a una temperatura de 37 °C y en ausencia de una fuente de fucosa externa, donde la célula expresa una glicoproteína que comprende una región CH2 de inmunoglobulina y una región CH3 de inmunoglobulina, y asilar la glicoproteína del cultivo.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde el gen de FX codifica una proteína FX que tiene un aminoácido en una posición específica seleccionada de una serina en la posición 79, una lisina en la posición 90,

una leucina en la posición 136, una arginina en la posición 211 y una combinación de los mismos.

15. El método de la reivindicación 13, SEC ID N° la glicoproteína es un anticuerpo.

5

10 20 30 40 50 60 70
 MGEFQGSMRILVLTGSGSLVGGKAIQKVVADGAGLPGEDWVVFSSKDDADLTDAAQTAKVLPKTHVIHLA
 MGEFQGSMRILVLTGSGSLVGGKAIQKVVADGAGLPGEDWVVFSSKDDADLTDAAQTAKVLPKTHVIHLA
 MGEFQGSMRILVLTGSGSLVGGKAIQKVVADGAGLPGEDWVVFSSKDDADLTDAAQTAKVLPKTHVIHLA
 MGEFQGSMRILVLTGSGSLVGGKAIQKVVADGAGLPGEDWVVFSSKDDADLTDAAQTAKVLPKTHVIHLA
 MGEFQGSMRILVLTGSGSLVGGKAIQKVVADGAGLPGEDWVVFSSKDDADLTDAAQTAKVLPKTHVIHLA
 80 90 100 110 120 130 140
 AMVGGLFERNIKYNLDFWRKKNVHINDNVLHSAFEVGAQKVVSCSLSTCIPFDKTTYPIDEPMIHNGPPHSSN
 AMVGGLFERNIKYNLDFWRKKNVHINDNVLHSAFEVGAQKVVSCSLSTCIPFDKTTYPIDEPMIHNGPPHSSN
 AMVGGLFERNIKYNLDFWRKKNVHINDNVLHSAFEVGAQKVVSCSLSTCIPFDKTTYPIDEPMIHNGPPHSSN
 AMVGGLFERNIKYNLDFWRKKNVHINDNVLHSAFEVGAQKVVSCSLSTCIPFDKTTYPIDEPMIHNGPPHSSN
 AMVGGLFERNIKYNLDFWRKKNVHINDNVLHSAFEVGAQKVVSCSLSTCIPFDKTTYPIDEPMIHNGPPHSSN
 150 160 170 180 190 200 210
 FGYSYAKRMIQVQNRAYFQYGGCTFTAVIPITNVFPGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSSALTVVWGT
 FGYSYAKRMIQVQNRAYFQYGGCTFTAVIPITNVFPGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSSALTVVWGT
 FGYSYAKRMIQVQNRAYFQYGGCTFTAVIPITNVFPGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSSALTVVWGT
 FGYSYAKRMIQVQNRAYFQYGGCTFTAVIPITNVFPGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSSALTVVWGT
 FGYSYAKRMIQVQNRAYFQYGGCTFTAVIPITNVFPGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSSALTVVWGT
 220 230 240 250 260 270 280
 GKPRRQFIYSLDLALQLFIVWLREYNEVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFFHGEVTFDTSKSDGGQY
 GKPRRQFIYSLDLALQLFIVWLREYNEVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFFHGEVTFDTSKSDGGQY
 GKPRRQFIYSLDLALQLFIVWLREYNEVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFFHGEVTFDTSKSDGGQY
 GKPRRQFIYSLDLALQLFIVWLREYNEVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFFHGEVTFDTSKSDGGQY
 GKPRRQFIYSLDLALQLFIVWLREYNEVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFFHGEVTFDTSKSDGGQY
 280 290 300 310 320
 KKTASNKLRITLPLDFFRFTPFKQAVKETCAWF TDNYEQARK
 KKTASNKLRITLPLDFFRFTPFKQAVKETCAWF TDNYEQARK
 KKTASNKLRITLPLDFFRFTPFKQAVKETCAWF TDNYEQARK
 KKTASNKLRITLPLDFFRFTPFKQAVKETCAWF TDNYEQARK
 KKTASNKLRITLPLDFFRFTPFKQAVKETCAWF TDNYEQARK

FIG. 1

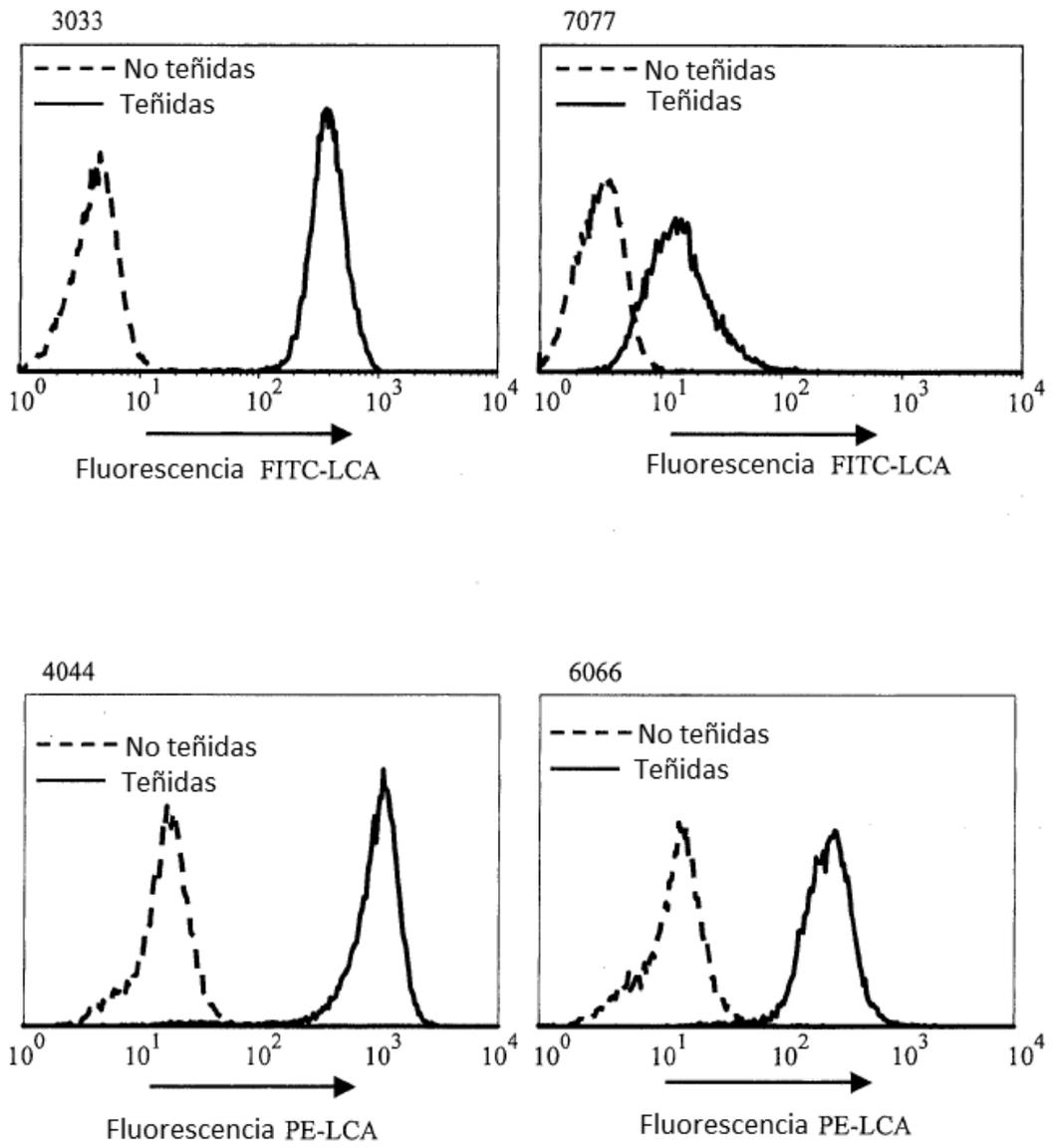


FIG. 2

Experimento I:

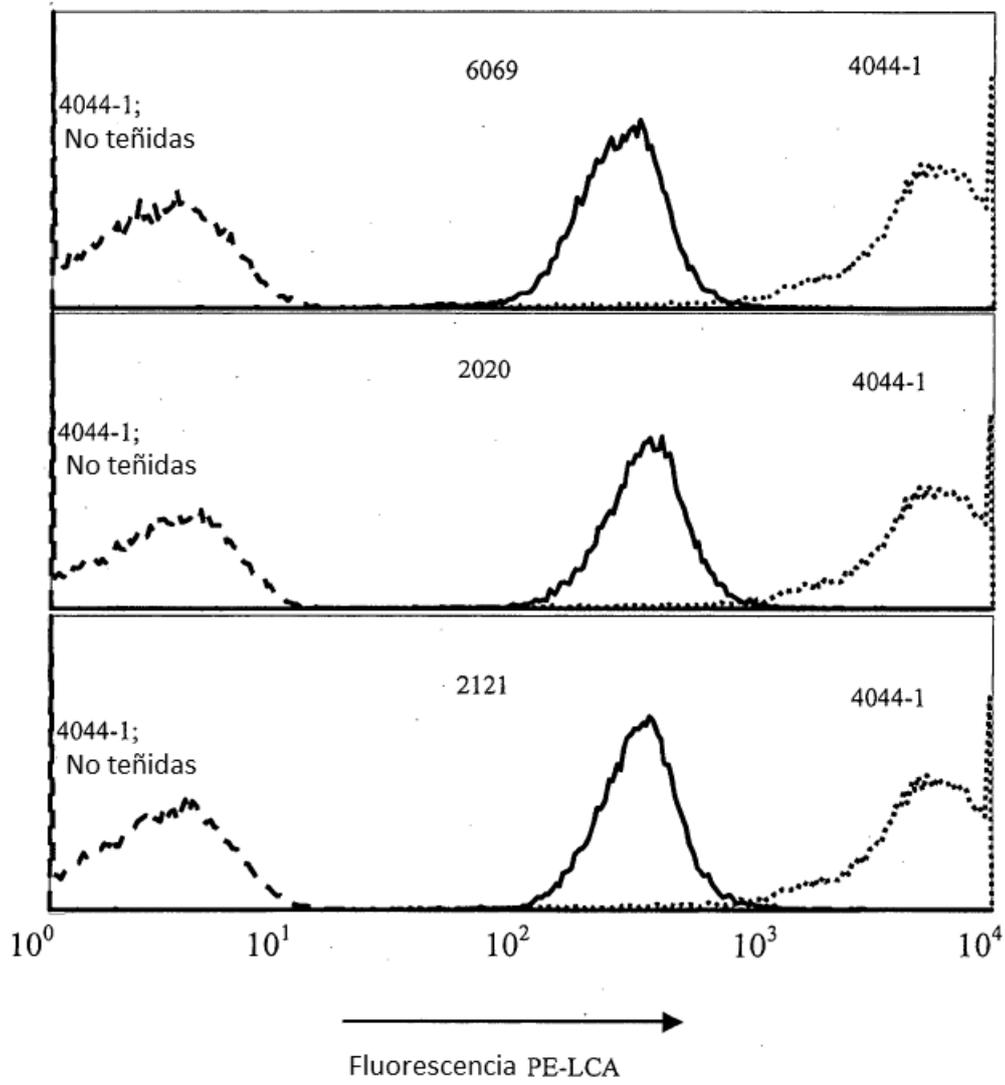


FIG. 3

10¹
Experimento II:

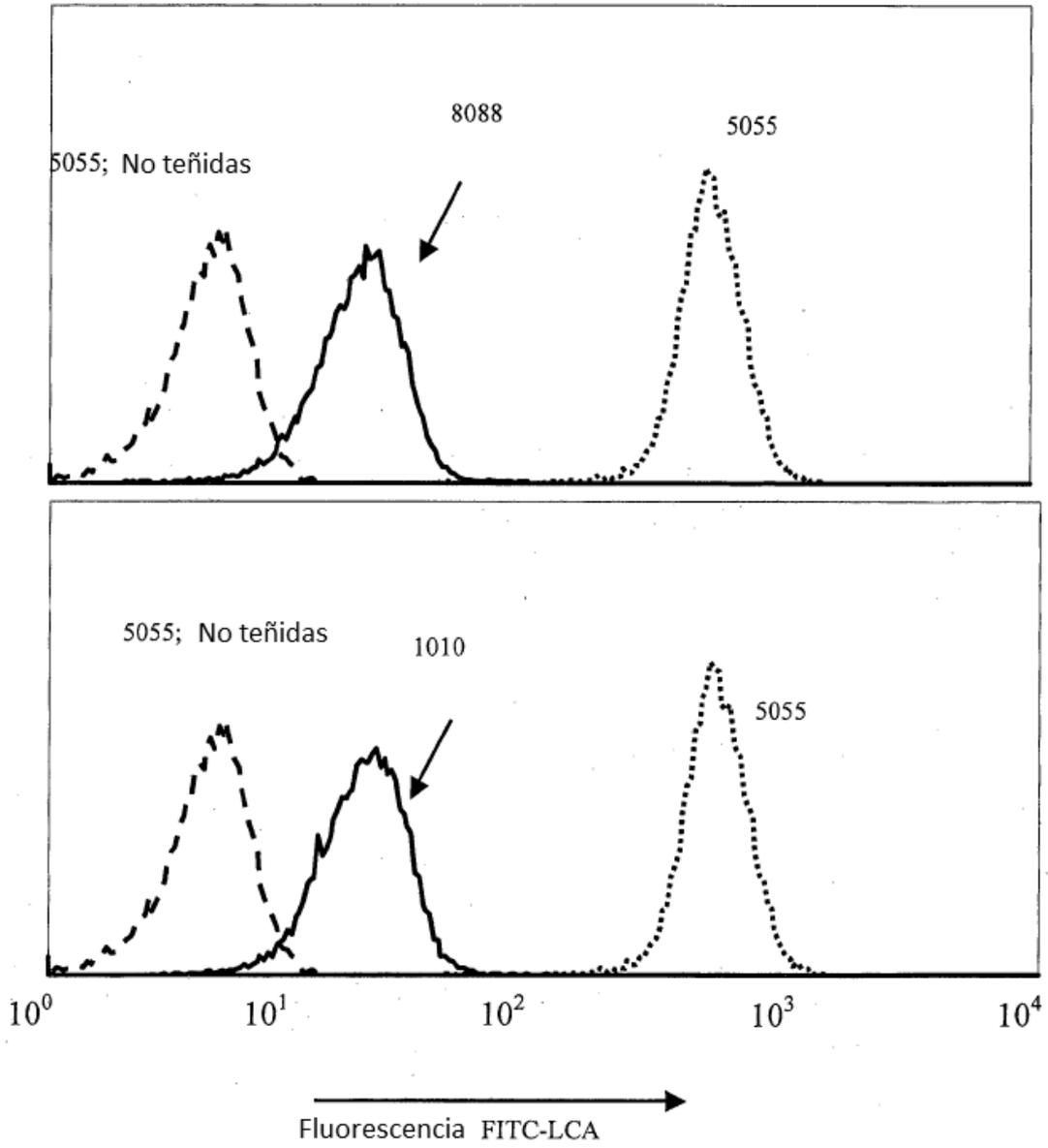


FIG. 4

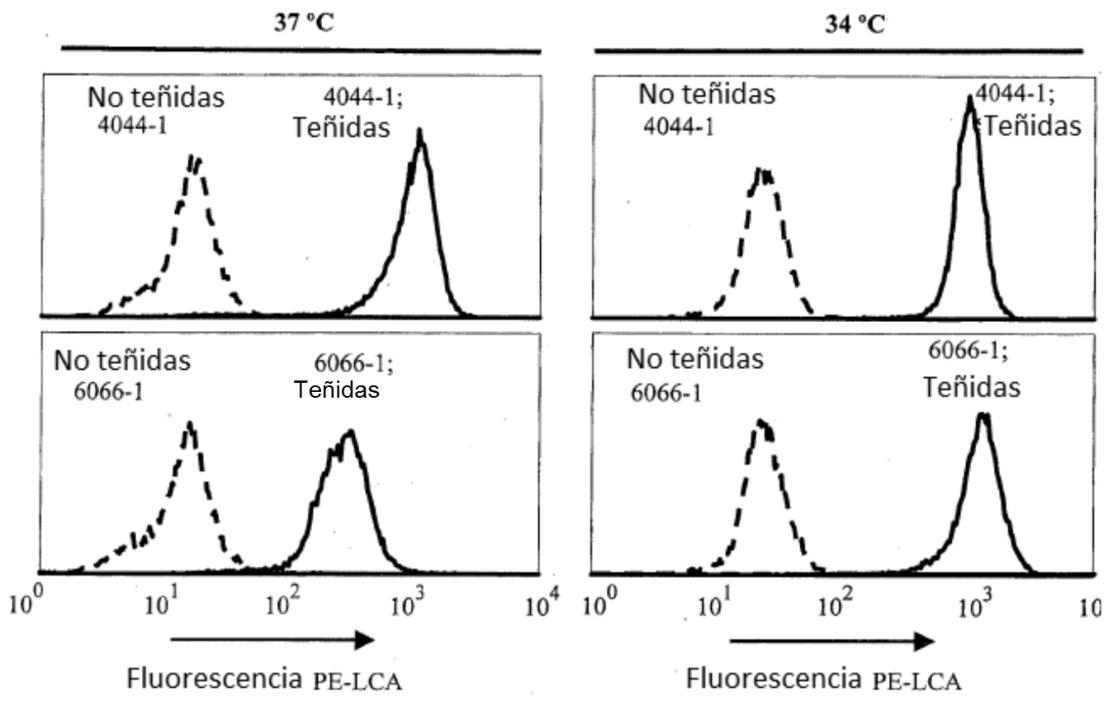


FIG. 5

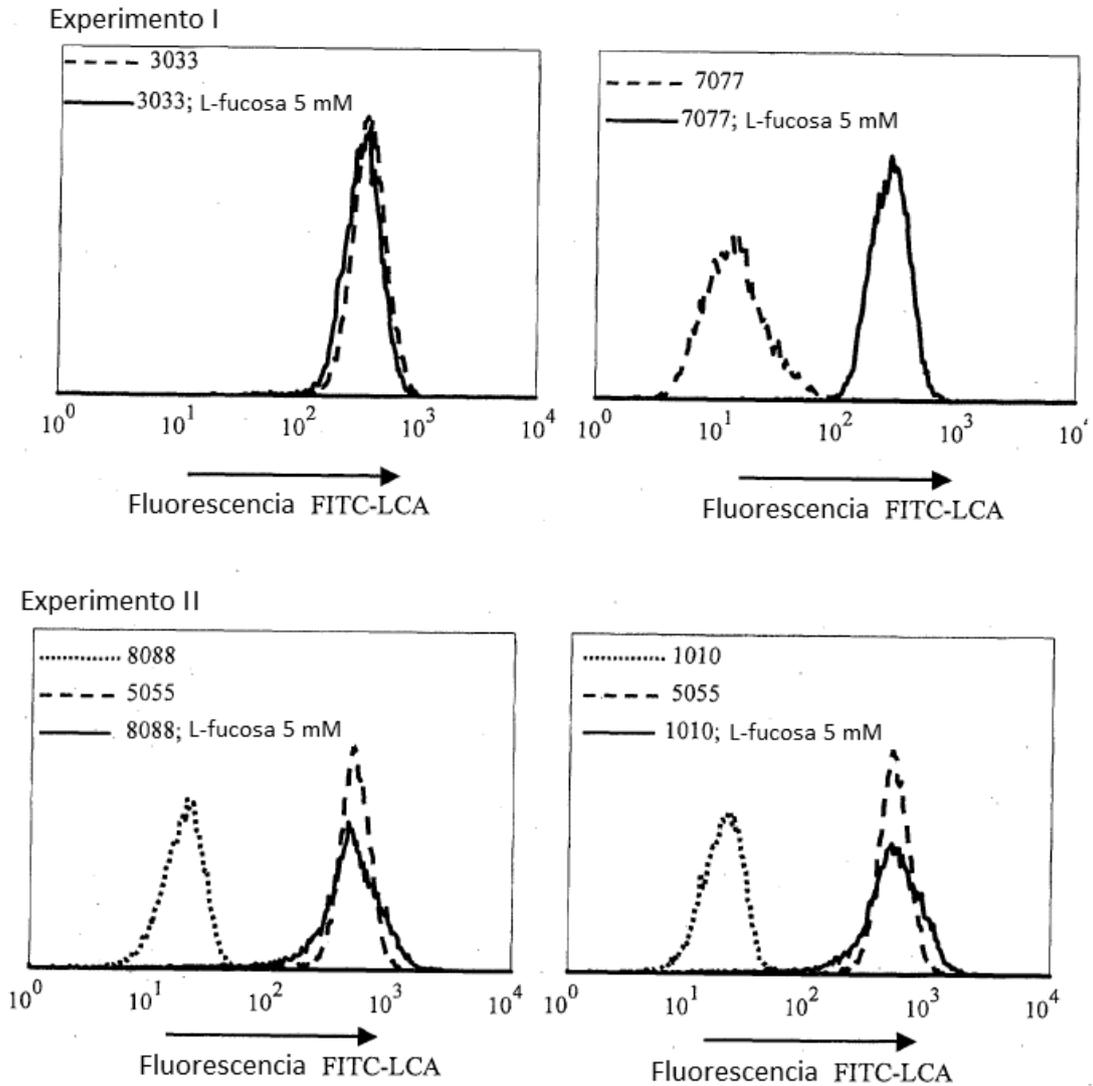


FIG. 6

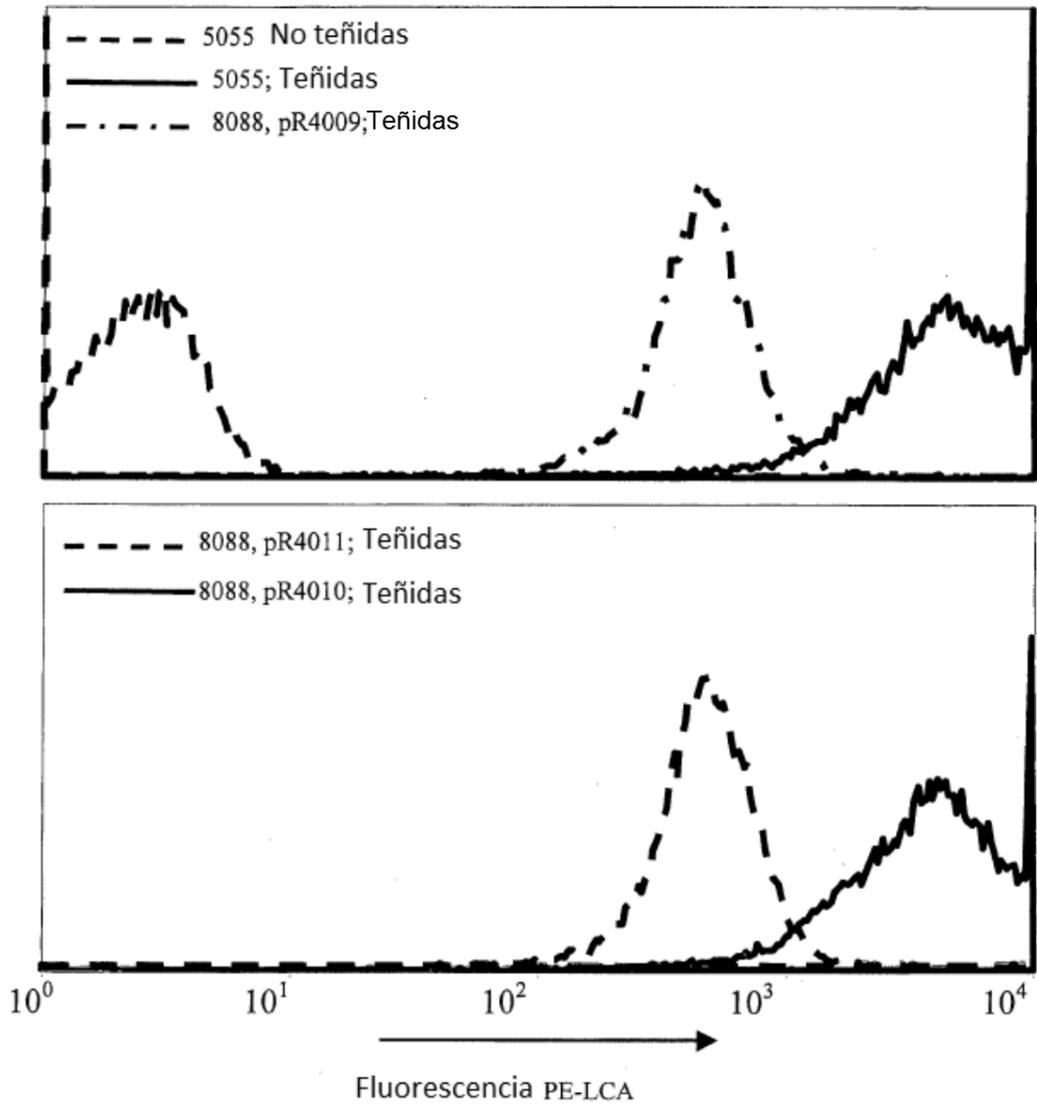


FIG. 7

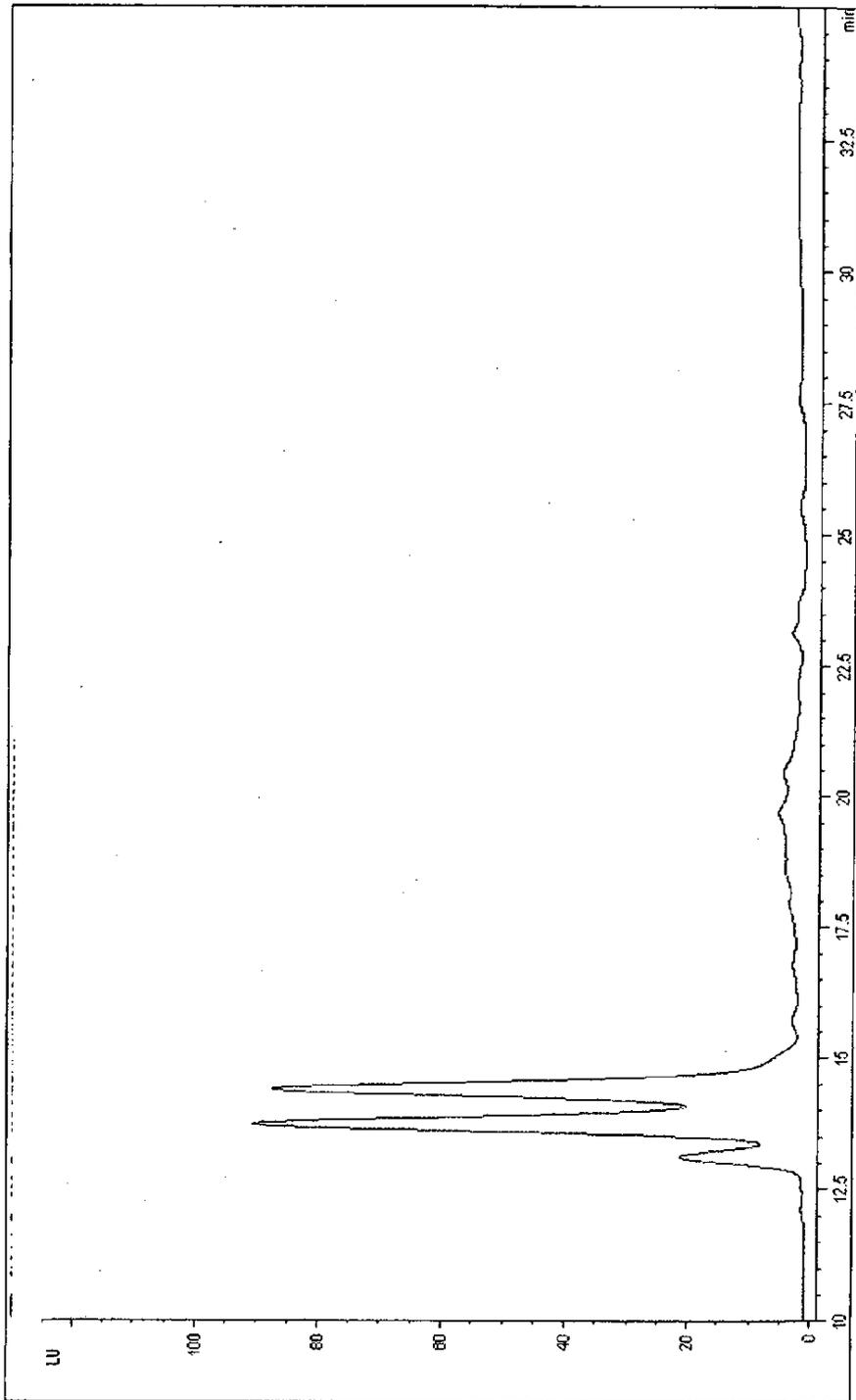


FIG. 8

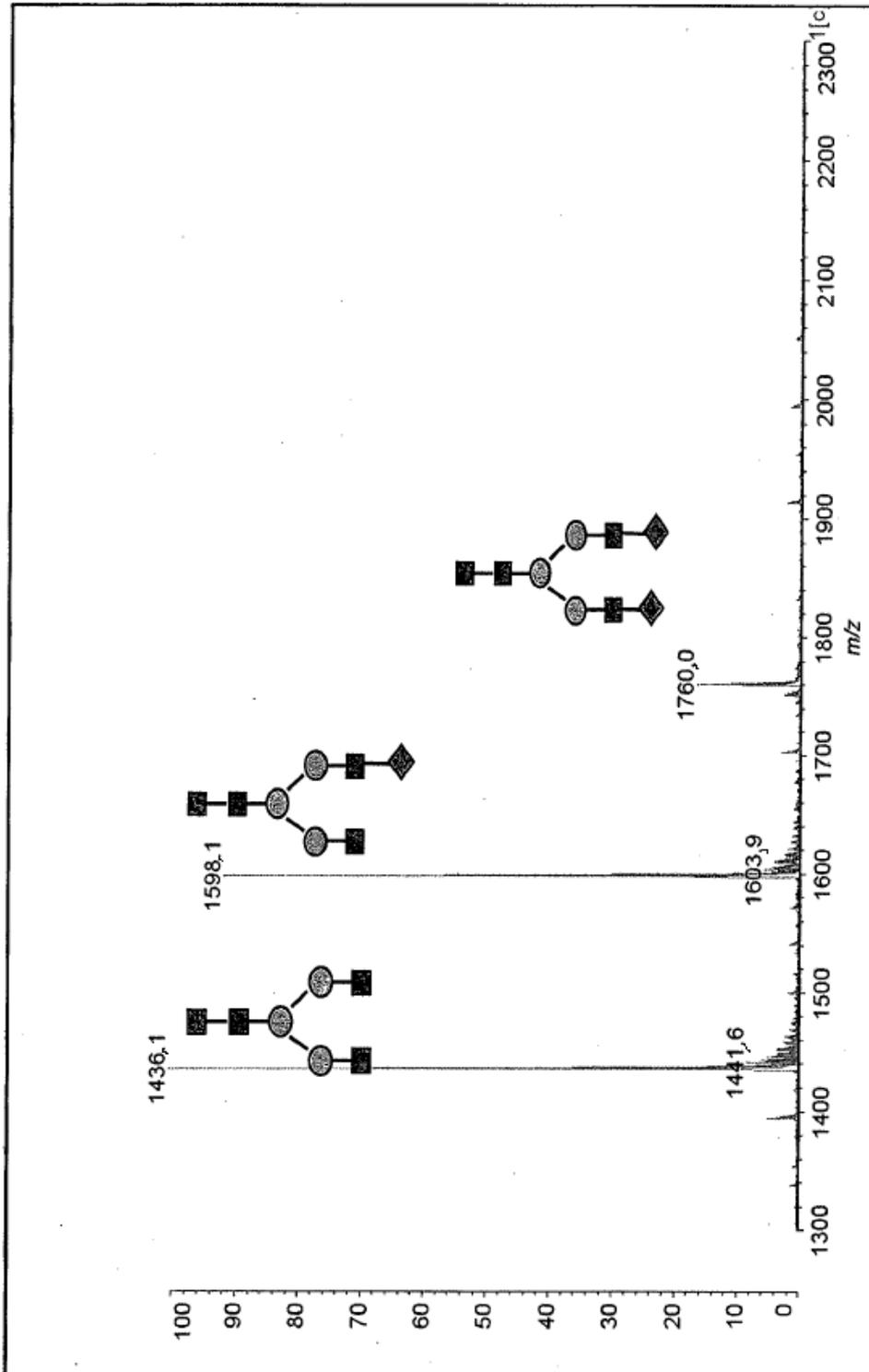


FIG. 9

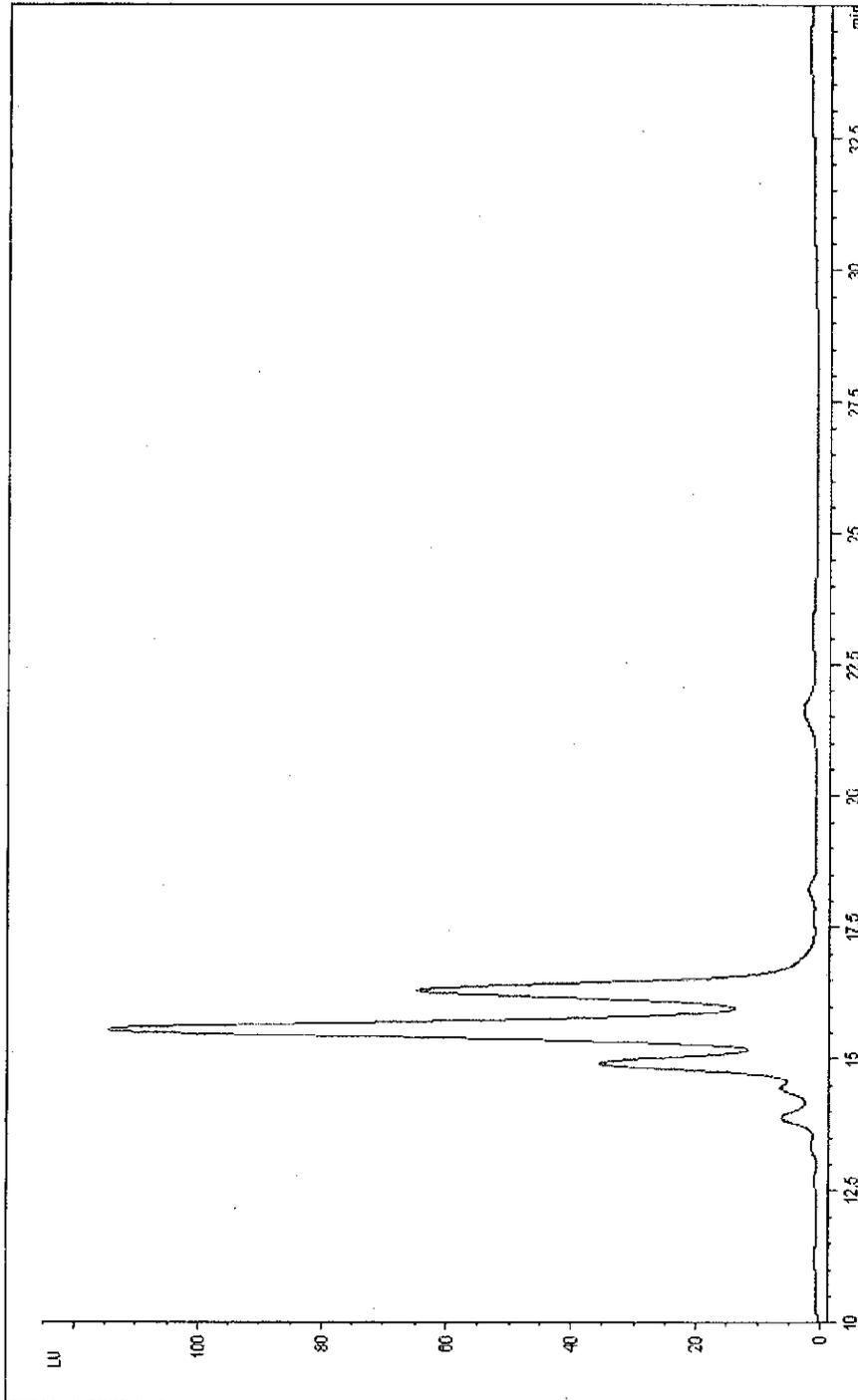


FIG. 10

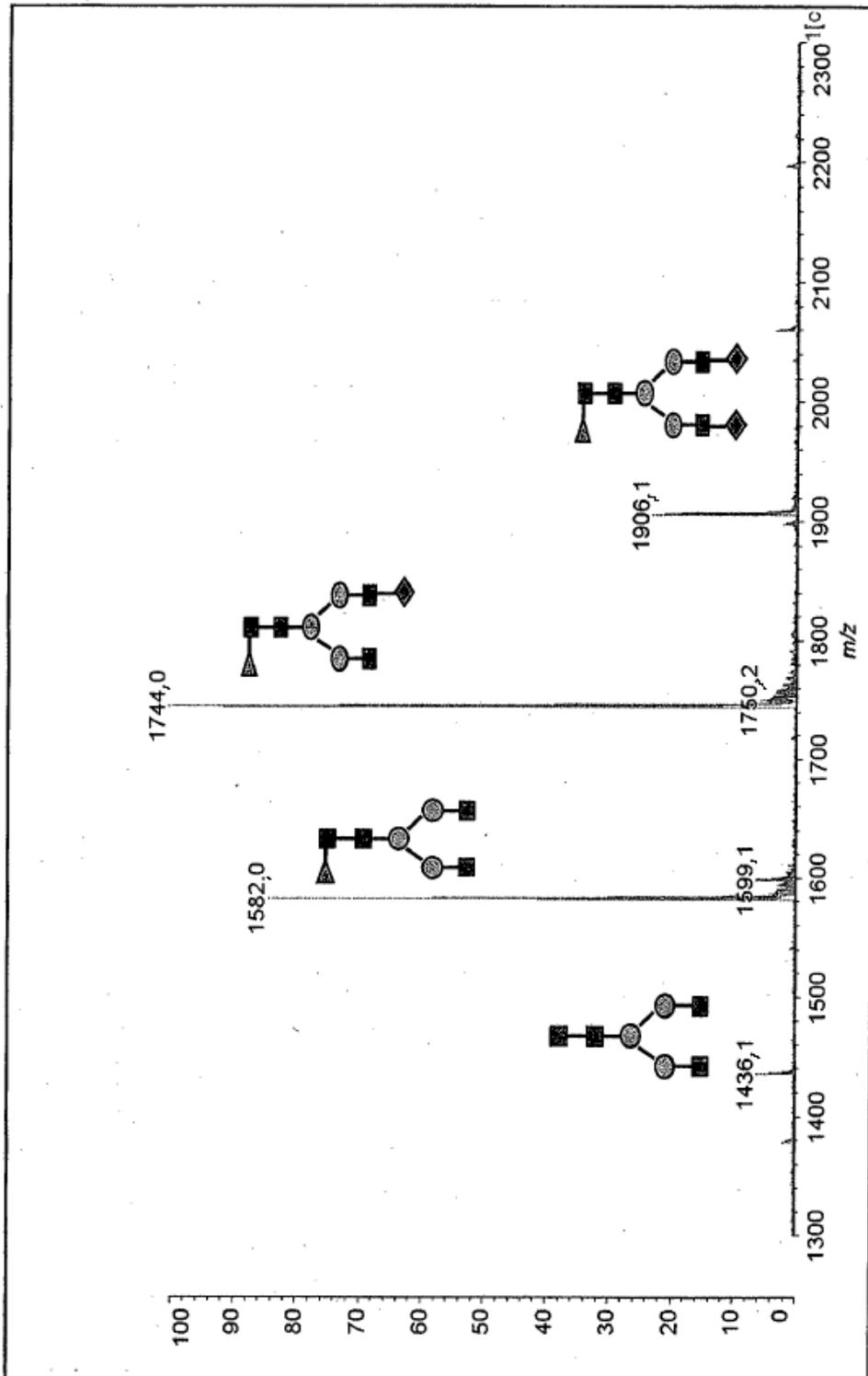


FIG. 11

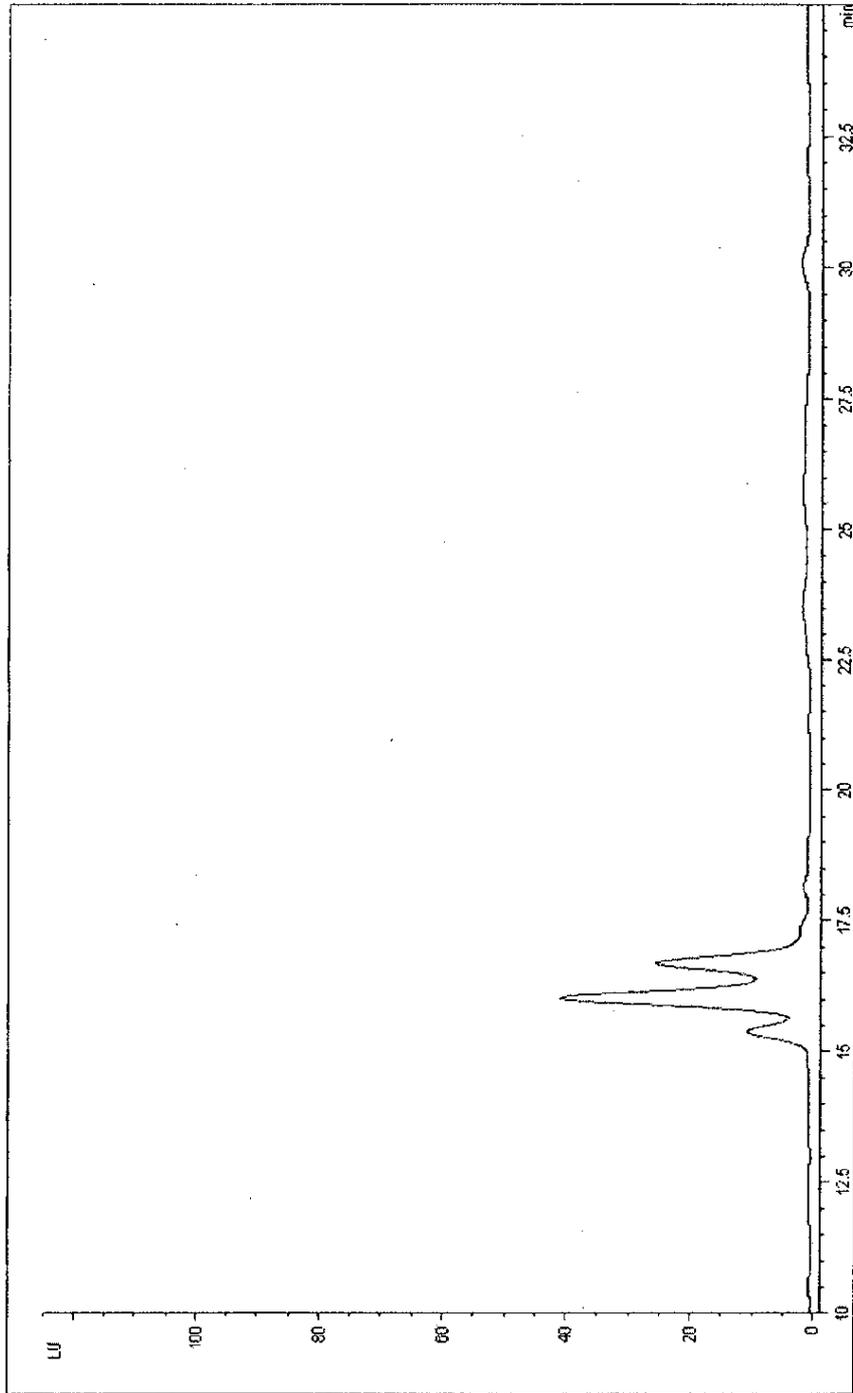


FIG. 12

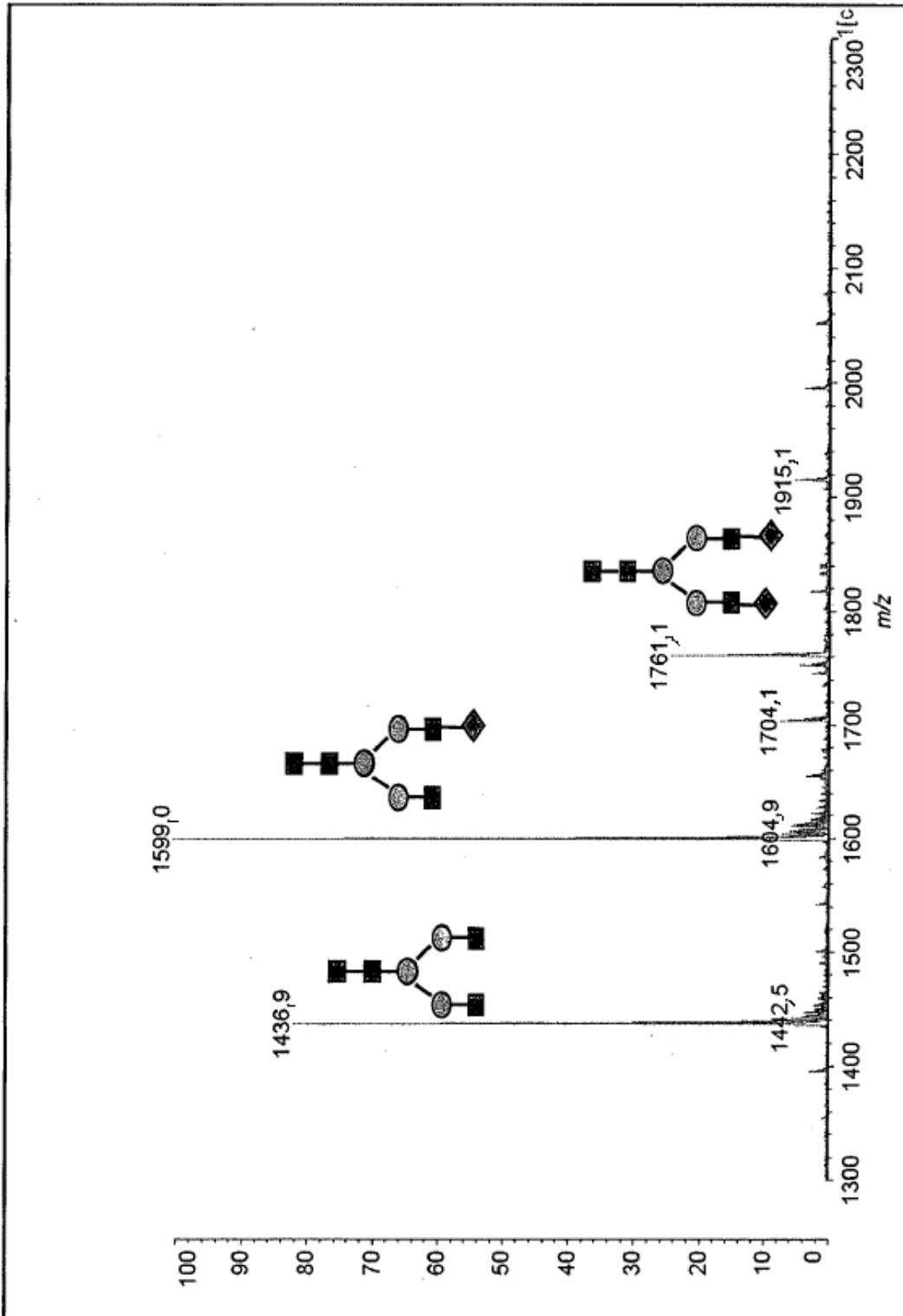


FIG. 13

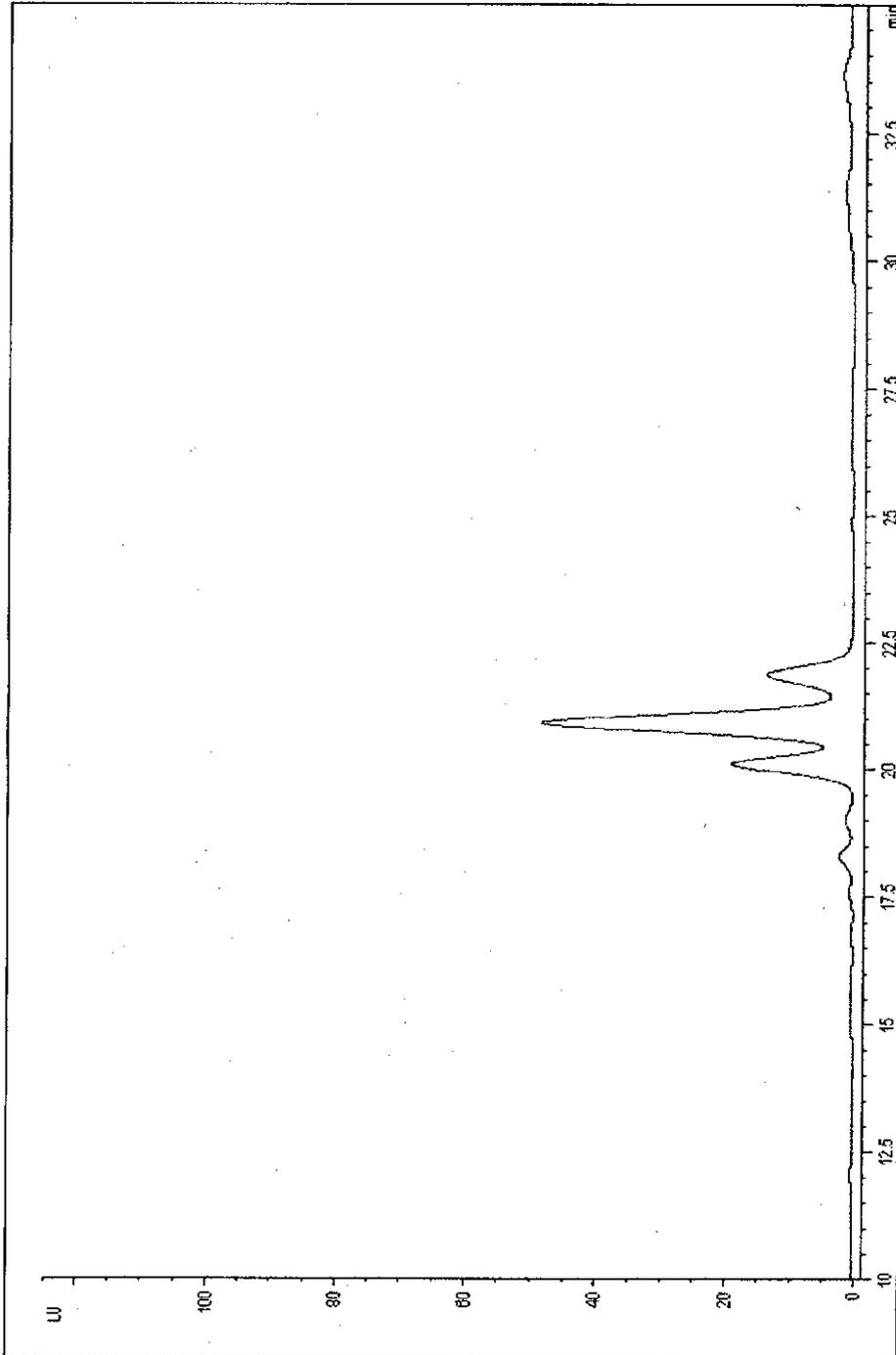


FIG. 14

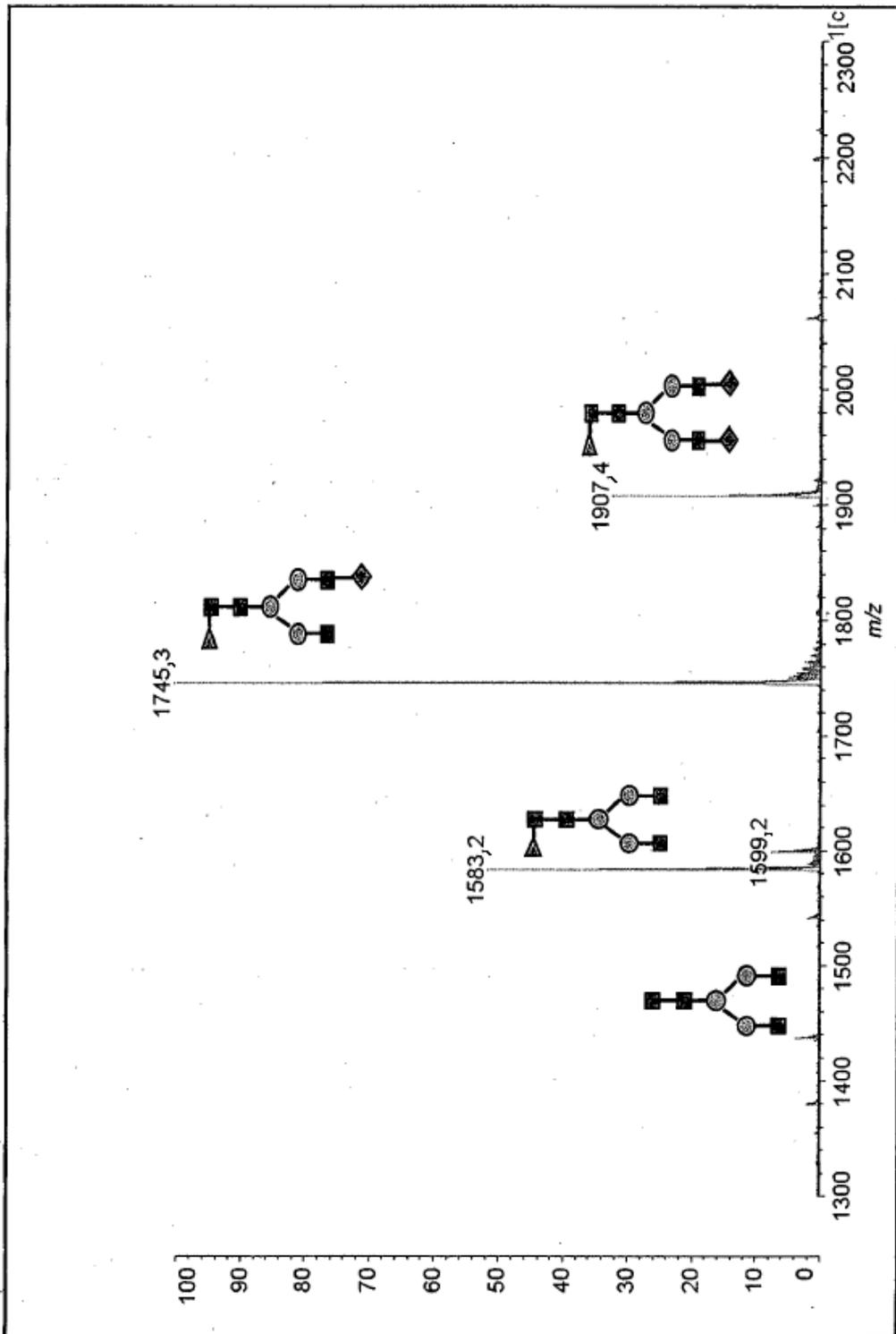


FIG. 15

