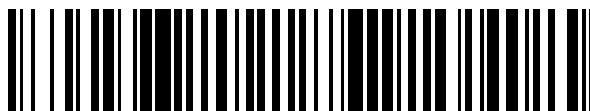


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 108**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2011 PCT/US2011/031637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11127322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2011 E 11766759 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2556163**

54 Título: **Método para cuantificar glicofomas que contienen alta manosa**

30 Prioridad:

**07.04.2010 US 321857 P**

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

**17.02.2017**

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
675 West Kendall Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**COLLINS, BRIAN, E.;  
DUFFNER, JAY;  
BOSQUES, CARLOS, J.;  
BULIK, DOROTA, A.;  
MYETTE, JAMES y  
MEADOR, JAMES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 602 108 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**

Método para cuantificar glicofomas que contienen alta manosa

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Un producto de glicoproteína típico difiere significativamente en términos de complejidad de un fármaco de molécula pequeña típico. Las estructuras de azúcar unidas al esqueleto del aminoácido de una glicoproteína pueden variar estructuralmente de muchas maneras, incluida la secuencia, la ramificación, el contenido de azúcar y la heterogeneidad. De esta forma, los productos de glicoproteínas pueden ser mezclas heterogéneas complejas de varias moléculas diversas estructuralmente que tienen en sí mismas estructuras de glicanos complejas. La glicosilación no solo aumenta la complejidad estructural de la molécula, sino que también afecta o condiciona varios de los atributos biológicos y clínicos de una glicoproteína.

10 Pace et al. (Analytical Letters, 42, 1711-1724, 2009) describen la caracterización de glicanos menores unidos a N menores en anticuerpos utilizando la liberación con Endo H y la espectrometría de masas MALDI.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15 La invención se basa, al menos en parte, en métodos y composiciones relacionados con el análisis y el control de estructuras de glicanos de alta manosa (estructuras Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y/o Man9) en glicoproteínas. La vía de glicanos unidos a N que muestra la síntesis de alta manosa y estructuras de glicanos complejas se muestra en la Figura 1.

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para cuantificar glicofomas que contienen alta manosa en una muestra de glicoproteínas, comprendiendo el método: (a) suministro de una muestra de glicoproteínas la cual comprende glicofomas que contienen glicanos de alta manosa, donde los glicanos de alta manosa están presentes con una abundancia de menos del 20% en relación con la masa total de glicanos de la muestra de glicoproteínas; (b) tratamiento de la muestra de glicoproteínas con Endoglicosidasa F3; y (c) cuantificación de las glicofomas que contienen alta manosa en la muestra tratada.

Métodos analíticos del producto

25 De forma más general, la presente divulgación se refiere, en algunos aspectos, a métodos para analizar estructuras de alta manosa en una preparación de glicoproteínas, por ejemplo, métodos para identificar y/o cuantificar glicanos de alta manosa o glicofomas. Estos métodos pueden utilizarse para medir uno o más de los siguientes aspectos: la presencia y/o la cantidad de alta manosa en una preparación de glicanos o de glicoproteínas (por ejemplo, en relación con la masa total de glicanos); las relaciones relativas de estructuras de alta manosa [por ejemplo, relaciones relativas de especies de alta manosa entre sí (por ejemplo, abundancias o relaciones relativas de Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y/o Man9 y sus isómeros), relaciones relativas de alta manosa con respecto a estructuras híbridas, relaciones relativas de alta manosa con respecto a estructuras complejas, relaciones relativas de alta manosa con respecto a estructuras fucosiladas]; la presencia o la abundancia de estructuras de alta manosa modificadas (por ejemplo, la presencia o la abundancia de estructuras de alta manosa fucosiladas).

35 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para analizar (identificar y/o cuantificar) glicofomas de alta manosa en una mezcla de glicoproteínas, por ejemplo, una preparación de glicoproteínas. El método incluye: (a) suministro de una muestra que contiene glicoproteína, (b) realización opcional de un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con digestión enzimática y/o análisis de espectrometría de masas (MS), (c) eliminación de glicanos de abundancia más alta de la muestra de glicoproteínas (por ejemplo, tratamiento de la muestra de glicoproteínas con una enzima que escinde glicanos fucosilados complejos de la glicoproteína, por ejemplo, tratamiento con endoglicosidasa F3), (d) reducción y alquilación opcionales de la muestra y/o realización de un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con espectrometría de masas. En un caso, una etapa siguiente (e) incluye la identificación y/o la cuantificación de glicofomas que contienen alta manosa en la muestra tratada (por ejemplo, mediante métodos electroforéticos, como electroforesis capilar (CE), LC-MS de fase inversa o LC-MS de fase inversa dirigida). En ciertos casos en las que se conocen las masas teóricas de las glicofomas que contienen alta manosa, puede establecerse un experimento de MS dirigido para monitorear únicamente conjuntos seleccionados de firmas m/z correspondientes a esas especies. En otro caso, la etapa (e) incluye, de manera alternativa, la identificación y/o la cuantificación de glicofomas de baja abundancia en la muestra tratada, incluidas, a modo no taxativo, glicofomas de alta manosa.

50 En un caso, el método es un método de alta resolución, por ejemplo, el método identifica y/o cuantifica de manera separada glicofomas individuales (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 glicofomas individuales) en una mezcla de glicoproteínas.

55 En un caso, la mezcla de glicoproteínas es una preparación de anticuerpos, por ejemplo, una preparación de anticuerpos farmacéutica. En un caso la preparación de anticuerpos se expresó a partir de un cultivo de células de mamífero.

- 5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para analizar (identificar y/o cuantificar) estructuras de alta manosa y/o híbridas en una preparación de glicanos o de glicoproteínas. El método incluye (a) suministro de una mezcla de glicanos o de glicoproteínas, (b) tratamiento de la mezcla de glicanos o de glicoproteínas con una enzima que escinde los residuos de manosidasa terminales expuestos en el extremo no reductor de una glicofoma y (c) cuantificación de los residuos de manosa terminales escindidos. En un caso, la etapa de cuantificación incluye la realización de análisis de monosacáridos cuantitativo (por ejemplo, mediante HPLC o GC-MS). En un caso, las manosas terminales liberadas se cuantifican en relación con la masa total de glicanos y, de este modo, se analizan las estructuras de alta manosa y/o híbridas en una preparación de glicanos o de glicoproteínas.
- 10 En un caso, la preparación de glicoproteínas es una preparación de anticuerpos, por ejemplo, una preparación de anticuerpos farmacéutica. En un caso la preparación de anticuerpos se expresó a partir de un cultivo de células de mamífero.
- 15 En algunos casos, el método analítico descrito en la presente detecta estructuras de alta manosa presentes en baja abundancia en una preparación de glicoproteínas, por ejemplo, el método detecta estructuras de alta manosa, por ejemplo, una o más Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y/o Man9 presentes en una abundancia de menos del 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,1% o menos del 0,05% en relación con la masa total de glicanos.
- 20 En algunos casos, el método es un método de alto rendimiento, por ejemplo, todas las etapas del método pueden completarse en menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 horas por muestra; el método puede utilizarse para procesar al menos 5 muestras por día. En otro caso, pueden ejecutarse más de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 muestras por día mediante el uso de un operador y un instrumento por método. En otro caso, el método requiere una preparación mínima de muestras (por ejemplo, la preparación de muestras incluye solo un intercambio de solución amortiguadora opcional, no requiere varias etapas de limpieza o purificación y/o procedimientos de derivatización).
- En un caso, el método es un método realizado en condiciones de GMP.
- 25 En un caso, la glicoproteína es una inmunoglobulina (IgG) (por ejemplo, un anticuerpo terapéutico como un IgG1, IgG2) o una fusión de Ig (por ejemplo, una fusión de receptor terapéutico Fc). Algunos ejemplos incluyen: bevacizumab, tositumomab, abciximab, alemtuzumab, acritumomab, cetuximab, adalimumab, ranibizumab, gemtuzumab, efalizumab, infliximab, abciximab, rituximab, basiliximab, eculizumab, palivizumab, omalizumab, daclizumab, ibritumomab tiuxetán, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, muromonab-CD3, natalizumab, panitumumab, ranibizumab, tositumomab, alefacept, etanercept y abatacept.
- 30 En otros casos, la glicoproteína es una hormona terapéutica (por ejemplo, FSH), un interferón, una eritropoyetina, un factor de estimulación de la colonia o una enzima de reemplazo terapéutico (por ejemplo, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa).
- 35 Los métodos de la presente divulgación pueden utilizarse para evaluación de estructuras de alta manosa en una o más etapas del desarrollo en la producción de una glicoproteína terapéutica u otra glicoproteína comercialmente relevante, por ejemplo, durante la selección de la célula huésped, la selección clonal, la optimización de medios, la determinación de las condiciones del cultivo, las condiciones del proceso y/o los procedimientos de purificación.
- 40 Los métodos descritos en la presente también pueden emplearse para monitorear el grado y/o el tipo de glicanos de alta manosa producidos en un cultivo celular, permitiendo de este modo el ajuste o la terminación posible del cultivo a fin de, por ejemplo, lograr un patrón u objetivo particular deseado de alta manosa o evitar el desarrollo de un patrón u objetivo particular no deseado de alta manosa. En algunos casos, los métodos pueden usarse para comparar el grado y/o el tipo de glicosilación de alta manosa que ocurre en diferentes cultivos celulares. En algunos casos, los métodos pueden usarse para monitorear el patrón de glicosilación de glicoproteínas producido durante el transcurso de su producción por las células. Por ejemplo, la producción de una glicoproteína (por ejemplo, producción comercial) puede involucrar etapas para (1) cultivar células que producen la glicoproteína, (2) obtener muestras a intervalos regulares o irregulares durante el cultivo y (3) analizar el patrón de glicosilación de la o las glicoproteínas producidas en las muestras obtenidas. En algunos casos, dichos métodos pueden incluir una etapa de comparación de los patrones de glicosilación de las glicoproteínas producidas en las muestras obtenidas entre sí. En algunos casos, dichos métodos pueden incluir la comparación de patrones de glicosilación de las glicoproteínas producidas en las muestras obtenidas con el patrón de glicosilación de una muestra de referencia (como una muestra de control, o un GMP o un estándar o especificación farmacéutica).
- 45 50
- 55 Los métodos descritos también pueden usarse para evaluar características de glicosilación de alta manosa de células o líneas celulares que se tienen en cuenta para la producción de una glicoproteína particular deseada (por ejemplo, incluso antes de que se hayan diseñado las células o las líneas celulares para producir la glicoproteína o para producir la glicoproteína a un nivel pertinente desde un punto de vista comercial).
- Los métodos de la presente divulgación pueden aplicarse a glicanos o glicoproteínas obtenidos de una amplia variedad de fuentes, incluidas, a modo no taxativo, formulaciones terapéuticas y muestras biológicas. Una muestra biológica puede someterse a uno o más análisis y/o etapas de purificación antes o después de haber sido analizada de acuerdo con la presente divulgación. Los métodos de la presente divulgación pueden utilizarse para analizar

glicanos en cualquiera de una variedad de estados, incluidos, por ejemplo, glicanos libres, glicoconjugados (por ejemplo, glicopéptidos, glicolípidos, proteoglicanos, etc.), glicanos asociados a células (por ejemplo, glicanos asociados al núcleo, al citoplasma o la membrana celular, etc.), glicanos asociados con componentes celulares, extracelulares, intracelulares y/o subcelulares (por ejemplo, proteínas), glicanos en espacio extracelular (por ejemplo medio de cultivo celular), etc.

En algunos casos, se conoce un patrón de glicosilación de alta manosa deseado para una glicoproteína objetivo específica, y los métodos descritos en la presente permiten monitorear muestras de cultivos para evaluar el progreso de la producción en una vía que, según se conoce, produce el patrón deseado. Por ejemplo, cuando la glicoproteína objetivo es una glicoproteína terapéutica, que, a modo de ejemplo, ha sido sometida a revisión reguladora en uno o más países, a menudo se deseará monitorear los cultivos para evaluar la probabilidad de que generen un producto con un patrón de glicosilación lo más cercano posible al patrón de glicosilación establecido del producto farmacéutico, independientemente de si se produce o no mediante la misma vía exacta. En dichos casos, las muestras del cultivo de producción se toman típicamente en distintos momentos y se comparan con un estándar establecido o con un cultivo de control a fin de evaluar la glicosilación relativa. Entre otras cosas, la presente divulgación puede facilitar análisis en tiempo real de glicosilación de alta manosa en sistemas de producción para proteínas terapéuticas.

Los métodos descritos en la presente también pueden emplearse para evaluar, controlar y/o comparar la calidad de los productos terapéuticos, por ejemplo, evaluar la presencia, las cantidades, las relaciones y/o las especies de estructuras de alta manosa en un producto de glicoproteína terapéutica o comercialmente relevante de cualquier otra manera. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en un ensayo de control de calidad, API o ensayo de liberación de fármacos y pueden incluir, por ejemplo, una etapa de liberación de un producto de glicoproteína para uso farmacéutico si el producto cumple con una especificación de referencia o control para estructuras de alta manosa. El nivel de referencia puede ser una especificación (por ejemplo, un estándar de GMP, una etiqueta de la FDA o prospecto del médico) o un criterio de calidad para la preparación farmacéutica que contiene la composición de glicoproteínas. En otros casos, la comparación se realiza con un registro histórico de un lote anterior o estándar y/o con una muestra de referencia de glicoproteína. Las características del análisis pueden registrarse, por ejemplo, en un registro de control de calidad (por ejemplo, un certificado de pruebas o un certificado de análisis).

En algunos casos, el nivel de referencia o el criterio de calidad corresponde a estructuras de alta manosa de no más del 20%, 15%, 12%, 10% presentes en una composición de glicoproteínas, por ejemplo, no más del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,2%, 0,1% o 0,05%. En un caso, la glicoproteína tiene estructuras de alta manosa (por ejemplo, tiene al menos alta manosa del 0,01%, 0,05% o 0,1%), pero no tiene más del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,2%, 0,1% o 0,05%, por ejemplo, tiene alta manosa entre el 0,05-20%, alta manosa entre el 0,05-15%, alta manosa entre el 0,05-10%, alta manosa entre el 1-10% y alta manosa entre el 1-5%. El nivel de las estructuras de alta manosa presentes en una composición de glicoproteínas, generalmente, pueden medirse como el nivel de glicanos que contienen estructuras de alta manosa en relación con la cantidad total de glicanos en una muestra, como una preparación de glicoproteínas.

En algunos casos, se enriquecerá un patrón de glicosilación de alta manosa deseado para una estructura en particular. Por ejemplo, en algunos casos, un patrón de glicosilación deseado tendrá niveles inferiores (por ejemplo, menos de aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% o menos) de estructuras de alta manosa, o niveles superiores (por ejemplo más de aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%) de estructuras de alta manosa, o niveles especificados de Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y/o Man9 (por ejemplo, enriquecimiento de Man5 y/o Man8 en relación con otras especies de alta manosa o en relación con la masa total de glicanos).

#### Métodos analíticos basados en células

Se ha encontrado que diferentes vías celulares interactúan para determinar el patrón de glicanos de alta manosa presentes en glicoproteínas producidas a partir de una célula en particular. Se ha encontrado que el patrón de glicanos de alta manosa en una glicoproteína generada por una célula dependerá del equilibrio y los patrones de componentes formativos frente a los consuntivos descritos en la presente (por ejemplo, la expresión de ciertos genes y la disponibilidad de ciertos metabolitos descritos en la presente) relacionados inesperadamente con la biosíntesis de estructuras de alta manosa. Los patrones de expresión o disponibilidad de dichos componentes en una célula o población celular son indicativos o predictivos del patrón de estructuras de alta manosa producidas por la célula o la población celular, por ejemplo, son indicativos o predictivos del contenido de alta manosa de una glicoproteína terapéutica producida por dicha célula o población celular.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de evaluación de la capacidad y/o el potencial de una célula para producir estructuras de alta manosa. El método incluye: suministro de una célula y evaluación de dos o más (por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más o 10 o más) componentes de la maquinaria celular descritos en la presente, en donde el resultado de la evaluación es indicativo del patrón de glicanos de alta manosa presentes en una glicoproteína producida por la célula.

En un caso, los componentes de la maquinaria celular se seleccionan de:

*Glicosiltransferasas/enzimas*

- MGAT1 (GlcNAc T1);
- Alfa-manosidasa II, IIx;
- Alfa-manosidasa IB;
- 5      • Alfa-manosidasa IA;
- FucT1-9;
- Glucosidasa (por ejemplo, GCS1, GANAB).
- Niveles de precursores
- UDP-GlcNAc
- 10     • GDP-Man
- UDP/UTP
- GDP/GTP
- Uridina
- Guanosina

15    *Biosíntesis o localización o tráfico de precursores*

- GNE (glucosamina (UDP-N-acetil)-2-epimerasa/N-acetilmanosamina)
- UDP fosfatasa del aparato de Golgi
- Transportador de UDP-GlcNAc
- UAP-1 (UDP-N-acetilhexosamina pirofosforilasa)
- 20     • PGM-3 - fosfoglucomutasa 3
- NAGK - N-acetil-D-glucosamina quinasa
- GNPAT1 - glucosamina-fosfato N-acetiltransferasa 1
- UGP-2 - UDP-glucosa pirofosforilasa 2
- UGDH - UDP-glucosa 6-deshidrogenasa
- 25     • GAIK-1 - Galactoquinasa-1
- PGM-1 - Fosfoglucomutasa-1
- GCK – Glucoquinasa

*Objetivos para alterar la localización o el tráfico a través del RE y el aparato de Golgi*

- Chaperonas (BiP, SNARE, cpn, hsp)
- 30     • EDEM (proteína similar a manosidasa de degradación del RE)
- MANEA
- Receptor de manosa
- Arquitectura del aparato de Golgi, estructural

- Contenido lipídico del aparato de Golgi (esfingolípidos, contenido de colesterol)
- Componentes de tráfico (A1P1, VIP36)

- 5 En un caso se evalúa la relación de expresión de MGAT1 con respecto a alfa-manosidasa IB. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica que los niveles de Man5 en una glicoproteína producida por una célula serán elevados en relación con el grupo total de glicanos.
- En un caso se evalúa la relación de MGAT1 con respecto a alfa-manosidasa IA. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica que los niveles de Man5 en una glicoproteína producida por una célula serán elevados en relación con el grupo total de glicanos.
- 10 En un caso se evalúa la relación de expresión de MGAT1 con respecto a MGAT2. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica que los niveles de Man5 en una glicoproteína producida por una célula serán elevados en relación con el grupo total de glicanos.
- En un caso se evalúa la relación de expresión de NAGK/GNE y/o NAGK con respecto a MGAT2. Una relación baja de ambas, por ejemplo, cada una menos de 1, indica que los niveles de estructuras de alta manosa serán elevados en relación con el grupo total de glicanos.
- 15 En un caso se evalúa la relación de expresión de MGAT1 con respecto a glucosidasa. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica que los niveles de ciertas estructuras de alta manosa (Man5, Man6, Man7, Man8, y/o Man9) serán elevados en relación con el grupo total de glicanos.
- En un caso se evalúa la relación de expresión de manosidasa IA y IB. Las diferencias en la relación de expresión de estas puede afectar la composición de las estructuras de alta manosa (por ejemplo, Man8 y Man9 en particular) presentes en una proteína glicosilada.
- 20 En un caso se evalúa la relación de expresión de EDEM y manosidasa IA. Una relación elevada, por ejemplo, de más de 1, indicaría un sesgo hacia alta manosa en una glicoproteína producida en una célula.
- En un caso se evalúa la relación de expresión de manosidasa IIx y MGAT1. Una relación elevada, por ejemplo, de más de 1, indica un sesgo hacia manosa más baja en una glicoproteína producida en una célula.
- 25 En un caso se evalúa la relación de expresión de manosidasa IA y una glucosidasa 1,3 (GANAB). Una relación elevada, por ejemplo, de más de 1, indicaría un sesgo hacia alta manosa (por ejemplo, Man9) en una glicoproteína producida en una célula.
- En un caso se evalúa la relación de una fucosiltransferasa con respecto a manosidasa 1b. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica un enriquecimiento en alta manosa, por ejemplo, Man5.
- 30 En un caso se evalúa la relación de expresión de manosidasa II con respecto a manosidasa IB. Una relación baja, por ejemplo, de menos de 1, indica enriquecimiento en alta manosa, por ejemplo, Man5.
- En un caso se evalúa el nivel de expresión de VIP36. Los niveles de expresión de VIP36 influyen en el contenido de manosa de las glicoproteínas producidas en la célula. En un caso se evalúa la relación de expresión VIP36 y manosidasa IA. En un caso se evalúa la relación de expresión VIP36 y manosidasa IB.
- 35 En un caso se evalúa el nivel de UGP-2. Los niveles de expresión de UGP-2 influyen en el contenido de manosa de las glicoproteínas expresadas en la célula. En un caso se evalúa la relación de expresión de UGP-2 con respecto a manosidasa IB. Una relación elevada, por ejemplo, de más de 1, indicaría un nivel más elevado de estructuras de alta manosa.
- 40 En algunos casos, el método también incluye la selección de una célula como célula huésped para expresión de una glicoproteína terapéutica (tal como una molécula de IgG) en función del resultado del método de evaluación de la capacidad y/o el potencial de una célula para producir estructuras de alta manosa. Por ejemplo, en un caso la célula se selecciona como una célula huésped si el resultado del método de evaluación de la capacidad y/o el potencial de la célula para producir estructuras de alta manosa indica que la célula puede producir o producirá una glicoproteína con niveles bajos de estructuras de alta manosa (por ejemplo, estructuras de alta manosa <20%, <15%, <10%, <9%, <8%, <7%, <6%, <5%, <4%, <3%, <2%, <1%, <0,5% en relación con la masa total de glicanos). En otro ejemplo, en un caso la célula se selecciona como una célula huésped si el resultado del método de evaluación de la capacidad y/o el potencial de la célula para producir estructuras de alta manosa indica que la célula puede producir o producirá una glicoproteína con niveles más elevados de estructuras de alta manosa (estructuras de alta manosa de, por ejemplo, >10%, >15%, >20% en relación con la masa total de glicanos). En otro ejemplo, en un caso la célula se selecciona como una célula huésped si el resultado del método de evaluación de la capacidad y/o el potencial de la célula para producir estructuras de alta manosa indica que la célula puede producir o producirá una glicoproteína que tenga una estructura de alta manosa predeterminada (por ejemplo, una relación relativa predeterminada de una especie de alta manosa con respecto a otra, por ejemplo abundancias o relaciones relativas de Man4, Man5, Man6,
- 50

Man7, Man8 y/o Man9 y sus isómeros; relaciones relativas predeterminadas de alta manosa con respecto a estructuras híbridas, relaciones relativas predeterminadas de alta manosa con respecto a estructuras complejas, relaciones relativas predeterminadas de alta manosa con respecto a estructuras fucosiladas, abundancia predeterminada de estructuras de alta manosa modificadas, por ejemplo, estructuras de alta manosa fucosiladas).

- 5 En un caso, el método también incluye una etapa para diseñar genéticamente la célula seleccionada a fin de expresar una glicoproteína terapéutica, por ejemplo, una molécula terapéutica basada en IgG, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico o una proteína de fusión del receptor Fc, como bevacizumab, tositumomab, abciximab, alemtuzumab, acritumomab, cetuximab, adalimumab, ranibizumab, gemtuzumab, efalizumab, infliximab, abciximab, rituximab, basiliximab, eculizumab, palivizumab, omalizumab, daclizumab, ibritumomab tiuxetán, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, muromonab-CD3, natalizumab, panitumumab, ranibizumab, tositumomab, alefacept, etanercept, abatacept.

En algunos casos, el método también incluye la expresión y la cosecha de glicoproteínas a partir de la célula diseñada genéticamente y la evaluación de estructuras de alta manosa de la glicoproteína producida, por ejemplo, utilizando un método descrito en la presente.

#### 15 Métodos para controlar estructuras de alta manosa

- Se han desarrollado métodos para modular las estructuras de alta manosa. Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación se refiere a un método para modular la estructura de glicanos de una glicoproteína, por ejemplo, una glicoproteína terapéutica recombinante, por ejemplo, modulando la cantidad o el patrón de estructuras de alta manosa presentes en una glicoproteína terapéutica recombinante o una glicoproteína comercialmente relevante de cualquier otra manera. El método incluye (a) suministro de una célula huésped diseñada genéticamente para expresar una glicoproteína objeto y (b) cultivo de la célula en condiciones que permitan expresar la proteína recombinante, en donde la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula uno o más, por ejemplo, dos o más (por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más o 10 o más) componentes de la maquinaria celular descrita en la presente a fin de modular así la estructura de glicanos de alta manosa de una glicoproteína. En algunos casos, el contenido de alta manosa se evalúa durante el cultivo y/o al momento de cosechar las células o después.

- En un caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula una glicosiltransferasa descrita en la presente (por ejemplo, MGAT1). En un caso, la expresión de glicosiltransferasa se disminuye, pero no se suprime, por ejemplo, la expresión de glicosiltransferasa se disminuye en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en relación con una madre. En algunos casos, esto se logra mediante el uso de: ARNip, ARN antisentido, desactivación dirigida, mutación dirigida, modulación de concentración de un catión divalente (por ejemplo, Mn<sup>++</sup>, Mg<sup>+</sup>, Co<sup>++</sup> o Zn<sup>++</sup>), modulación de amoníaco, pH elevado (por ejemplo, mediante el uso de ulinastatina o cloroquina), inhibidores químicos (tales como: castanospermina, desoxinójirimicina, desoximanojirimicina, australina, 2,5-dihidroximetil-3,4 dihidroxipirrolidina, quifunensina, swainsonina, manostatina A, 1,4-didesoxi-1,4-imino-D-manitol), modulación (por ejemplo, adición) de ácido oleico, modulación (por ejemplo, adición) de ácido retinoico, modulación de factores de transcripción (por ejemplo, RFX1, Pax-4a, CHOP-10, COUP-TF1, MIF-1, Evi-1, MZF-1, STAT-6, Elk-1, MAZR).

- En un caso, el método incluye la complementación del medio de cultivo celular con un catión divalente, por ejemplo, manganeso (Mn<sup>++</sup>), por ejemplo, MnCl<sub>2</sub> (por ejemplo, desde 25-250 uM MnCl<sub>2</sub>, desde 25-150 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-100 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-75 uM MnCl<sub>2</sub> o 25-50 uM MnCl<sub>2</sub>). En este caso, el método aumenta los niveles de alta manosa en una preparación de la glicoproteína producida por la célula, por ejemplo, aumenta el nivel de HM5. En un caso, el nivel aumenta en al menos el 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más en relación con la glicoproteína producida por una misma célula huésped cultivada en el mismo medio no complementado con Mn<sup>++</sup>. En un caso, el método también aumenta el nivel de especies afucosiladas de la glicoproteína, por ejemplo, aumenta la relación de especies afucosiladas en relación con las especies fucosiladas en una preparación de la glicoproteína producida por la célula. Este caso también puede incluir una etapa de medición del nivel de alta manosa en la glicoproteína, por ejemplo, el nivel total de especies de alta manosa o el nivel de una o más HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o sus relaciones. Este caso también puede incluir una etapa de medición del nivel de fucosilación en la glicoproteína, por ejemplo, el nivel total de especies afucosiladas o la relación de especies afucosiladas con respecto a las fucosiladas en una preparación de la glicoproteína producida por la célula.

- En un caso, el método incluye la obtención o la determinación de la identidad o la cantidad de una glicofoma de alta manosa en una muestra de glicoproteínas, por ejemplo, mediante un método descrito en la presente, y la complementación del medio de cultivo celular con un catión divalente, por ejemplo, manganeso (Mn<sup>++</sup>), por ejemplo, MnCl<sub>2</sub> (por ejemplo, desde 25-250 uM MnCl<sub>2</sub>, desde 25-150 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-100 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-75 uM MnCl<sub>2</sub> o 25-50 uM MnCl<sub>2</sub>), a fin de aumentar así los niveles de alta manosa en una preparación de la glicoproteína producida por la célula, por ejemplo, aumenta el nivel de HM5. En un caso, el nivel aumenta al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más en relación con la glicoproteína producida por una misma célula huésped cultivada en el mismo medio no complementado con Mn<sup>++</sup>. En un caso, el método incluye la complementación del medio de cultivo celular con un catión divalente, por ejemplo, manganeso (Mn<sup>++</sup>), por ejemplo, MnCl<sub>2</sub> (por ejemplo, desde 25-250 uM MnCl<sub>2</sub>, desde 25-150 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-100 uM MnCl<sub>2</sub>, 25-75 uM MnCl<sub>2</sub> o 25-50 uM MnCl<sub>2</sub>), la obtención y la determinación de la identidad o la cantidad de una glicofoma de alta manosa, por ejemplo, mediante un método descrito en la presente,

en una muestra de glicoproteínas, la comparación de la identidad o la cantidad de glicofomas de alta manosa con la identidad o la cantidad de una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de control, o un GMP o un estándar o especificación farmacéutica) y la toma de una decisión con respecto a la glicoproteína, por ejemplo una decisión descrita en la presente.

- 5 En un caso, el método también aumenta el nivel de especies afucosiladas de la glicoproteína, por ejemplo, aumenta la relación de especies afucosiladas en relación con las especies fucosiladas en una preparación de la glicoproteína producida por la célula. Este caso también puede incluir una etapa de medición del nivel de alta manosa en la glicoproteína, por ejemplo, el nivel total de especies de alta manosa o el nivel de una o más HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o sus relaciones. Este caso también puede incluir una etapa de medición del nivel de fucosilación en la glicoproteína, por ejemplo, el nivel total de especies afucosiladas o la relación de especies afucosiladas con respecto a las fucosiladas en una preparación de la glicoproteína producida por la célula.

10 En un caso, el nivel de alta manosa se aumenta mediante la disminución de la expresión de un gen divulgado en la presente, por ejemplo, MGAT1, en donde la expresión se disminuye mediante un método o un agente que resulta en una relación no lineal entre la reducción de la expresión del gen, por ejemplo, MGAT1, y el aumento en la alta manosa. En un caso, una representación gráfica de la reducción en la expresión, por ejemplo, de MGAT1, y el aumento en alta manosa tiene básicamente tres fases: una fase en la que la reducción de expresión tiene un efecto pequeño o no tiene ningún efecto en el nivel de alta manosa (no aumenta significativamente la alta manosa), una fase en la que la reducción en el nivel de expresión es básicamente lineal con el aumento de alta manosa y una fase en la que la reducción adicional en la expresión del gen causa un pequeño aumento o ningún aumento de alta manosa. En un caso, en un método para aumentar la alta manosa, el nivel de expresión del gen, por ejemplo, expresión de MGAT1, se encuentra en la fase lineal. En un caso, la reducción se encuentra en la mitad de la fase lineal justo antes de la fase máxima y no lineal. En un caso, la reducción se encuentra en el último 25, 10, 5 o 1% de la fase lineal justo antes de la fase máxima y no lineal. En un caso, el nivel de reducción no es más que 1,5, 2,0 o 4,0 veces mayor que el nivel de reducción de la expresión génica en el punto de inflexión entre la fase lineal y la fase en la que las reducciones adicionales en la expresión génica para no proporcionar un aumento significativo adicional en alta manosa.

15 En un caso, la célula huésped está sujeta a una cosecha de etapa retrasada o tardía. En algunos casos, esto incluye el retraso de la cosecha hasta que la viabilidad de las células sea inferior al 40%, 30%, 20% o 10%. En otros casos, esto involucrará el retraso de la cosecha hasta que la cantidad de células sea superior a  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  o  $15 \times 10^6$  células/ml. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir, de manera no taxativa, a la realización de la cosecha una vez que los niveles de los componentes de los medios hayan alcanzado un nivel objetivo inferior al 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% o 0% de los niveles iniciales. Los componentes de estos medios pueden incluir, a modo no taxativo, glucosa, galactosa, glutamina o niveles de aminoácidos. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir, de manera no taxativa, a la realización de la cosecha una vez que los niveles de un subproducto celular hayan alcanzado un nivel objetivo que suponga un aumento de más de 2, 4, 6, 8, o 10 veces respecto a los niveles iniciales. Estos subproductos pueden incluir, a modo no taxativo, amoníaco y lactato. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir al retraso del momento de una cosecha en comparación con un protocolo de alimentación existente. Esto puede involucrar, a modo no taxativo, retrasar el momento de la cosecha por 6, 12, 18, 24, 48, 72 o 96 horas con respecto al proceso existente. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir al retraso del momento de una cosecha hasta que se alcance un valor de consumo de gas. Esto puede incluir, a modo no taxativo, el retraso del momento de la cosecha hasta que el nivel de consumo de oxígeno sea superior a 50, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 mmol/L. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir al retraso en la realización de la cosecha hasta que se alcance un múltiplo de uno, dos, tres o cuatro de los parámetros mencionados anteriormente. En otros casos, una cosecha retrasada puede referir al retraso de la cosecha hasta que se alcance una relación de dos de los parámetros mencionados anteriormente. Esto puede incluir, a modo no taxativo, una relación de lactato/glucosa inferior a 2, 1, 0,5, 0,25 o 0,1. De manera alternativa, esto puede incluir, a modo no taxativo, una relación de oxígeno/glucosa superior a 3, 4, 5, 6 o 7.

20 En un caso, la célula huésped está sujeta a una estrategia de alimentación retrasada. En algunos casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir, de manera no taxativa, a posponer la adición de nutrientes alimentados (por ejemplo, componentes de fosfato, glucosa, galactosa, aminoácidos, vitaminas, etc.) en un lote alimentado sistema de cultivo por perfusión hasta que la viabilidad celular sea inferior al 90%, 80% o 70% o hasta que las células alcancen una densidad celular particular, tal como más de  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células/ml. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir, de manera no taxativa, a la adición de nutrientes alimentados una vez que los niveles de los componentes de los medios hayan alcanzado un nivel objetivo inferior al 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los niveles iniciales. Los componentes de estos medios pueden incluir, a modo no taxativo, glucosa, galactosa, glutamina o niveles de aminoácidos. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir, de manera no taxativa, a la adición de nutrientes alimentados una vez que los niveles del subproducto celular hayan alcanzado un nivel objetivo que suponga un aumento de más de 2, 4, 6, 8, o 10 veces respecto a los niveles iniciales. Estos subproductos pueden incluir, a modo no taxativo, amoníaco y lactato. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir al retraso del inicio de una estrategia de alimentación en comparación con un protocolo de alimentación existente. Esto puede involucrar, a modo no taxativo, retrasar el momento de comienzo inicial por 6, 12, 18, 24, 48, 72 o 96 horas con respecto al comienzo de la alimentación en un proceso existente. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada



- puede referir al retraso del momento de las alimentaciones posteriores en comparación con un protocolo de alimentación existente. Esto puede involucrar, a modo no taxativo, retrasar cada momento de alimentación posterior por 6, 12, 18, 24, 48, 72 o 96 horas con respecto al punto de alimentación anterior. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir al retraso del momento de alimentación hasta que se alcance un valor de consumo de gas. Esto puede incluir, a modo no taxativo, el retraso del momento de alimentación hasta que el nivel de consumo de oxígeno sea superior a 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 mmol/L. En otros casos, una estrategia de alimentación retrasada puede referir al retraso de la alimentación hasta que se alcance un múltiplo de 2, 3 o 4 de los parámetros mencionados anteriormente. En otros casos, una alimentación retrasada puede referir al retraso de la alimentación hasta que se alcance una relación de dos del los parámetros mencionados anteriormente.
- 5 Este puede incluir, a modo no taxativo, una relación de lactato/glucosa inferior a 2, 1, 0,5, 0,25 o 0,1. De manera alternativa, esto puede incluir, a modo no taxativo, una relación de oxígeno/glucosa superior a 3, 4, 5, 6 o 7.
- 10 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula la arquitectura del aparato de Golgi, por ejemplo, manipulación (por ejemplo, adición al cultivo celular) de Brefeldina A, ácido micofenólico, Destruxina B, Concanamicina B, Leucinostatina A y Efrepeptinas.
- 15 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula el tráfico del aparato de Golgi, por ejemplo, modulación (por ejemplo, adición al cultivo celular) de componentes que afectan la gemación de un compartimento del aparato de Golgi con otro). Estos incluyen Brefeldina A, ácido micofenólico, Destruxina B, Concanamicina B, Leucinostatina A y Efrepeptinas.
- 20 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula los niveles de metabolitos o precursores, por ejemplo, modulación (por ejemplo, adición al cultivo celular) de galactosa 3'F UMP, UDP dialdehído, UDP, UTP, UDP ácido N-acetilmurámico, 5'aminooxi-uridina, 5'aminooxi-glicil-uridina, ManNAc. Dichos agentes pueden ser derivados de origen natural o no natural. Estos también pueden incluir manipulación dirigida de niveles o actividades de enzimas involucradas en la biosíntesis de los metabolitos o los precursores. Estos pueden incluir, a modo no taxativo, los descritos anteriormente (por ejemplo GNE, UAP-1, PGM-3, NAGK, GNPAT1, UGP-2, UGDH, GALK-1, PGM-1, GCK, UDP fosfatasa del aparato de Golgi, transportador de UDP-GlcNAc). Los mecanismos para manipular los niveles de enzimas incluyen mutagénesis dirigida, ARNip, ARN antisentido, desactivaciones dirigidas y análogos estructurales naturales y no naturales.
- 25 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula el contenido lipídico del aparato de Golgi, tal como la adición de inhibidores o biosíntesis de esfingolípidos (por ejemplo, fumonisina B1, fumonisina B2, L-cicloserina, DL-PDMP, DL-PPMP, DL-treo-dihidroesfingosina, miriocina, L-eritro MAPP, 3-O-metilesfingomielina, N-butildesoxinojirimicina u oleiletanolamida). En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula los niveles de colesterol, como la adición de un inhibidor de biosíntesis de colesterol (tal como isopentenil pirofosfato, ezetimiba, simvastatina, inhibidores o HMG-COA-reductasa) o la adición de un agente secuestrante de colesterol, como metil-β-ciclodextrina.
- 30 En otro caso, la célula huésped está sujeta a la manipulación de niveles de enzimas involucradas en la biosíntesis del lípido. Estas enzimas pueden encontrarse según se describe en *Molecular Biology of the Cell*, Alberts, Bray, Lewis, Raff, Robers, and Watson eds (1994). Los mecanismos para manipular los niveles de enzimas incluyen mutagénesis dirigida, ARNip, ARN antisentido, desactivaciones dirigidas y análogos estructurales y no naturales.
- 35 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula la afinidad de unión de las lectinas tipo L presentes en el RE o el aparato de Golgi (por ejemplo, VIPL VIP36) para intermediarios de alta manosa en la vía de glicosilación a través de cambios en el pH intracompartimental (por ejemplo, mediante el uso de ulinastatina o cloroquina).
- 40 En otro caso, la célula huésped está sujeta a manipulación que modula los componentes de "control de calidad" involucrados en glicosilación y plegamiento de proteínas, como EDEM, MANEA o GCS1.
- 45 En otro caso, la célula huésped está sujeta a una manipulación que modula la distribución intracelular (por ejemplo, la localización de estas enzimas preferentemente al RE o al aparato de Golgi) de manosidasa 1a y 1b.
- 50 En otro caso, la célula huésped está sujeta a manipulación que modula el nivel de expresión de la proteína que contiene la estructura de alta manosa (por ejemplo, un anticuerpo). Esto puede ser a través de la adición de agentes a la cromatina acetilada (por ejemplo, butirato). De manera adicional, puede ser a través del aumento del número de copias genéticas del gen que expresa la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, a través de amplificación de dhfr, a través de inserción dirigida, a través de inserción viral o a través de secuencias promotoras). En otros casos, esto puede ser a través del aumento de la tasa de transcripción o traducción de la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, a través de secuencias potenciadoras, a través de optimización con codones o secuencias promotoras).
- 55 En un caso, el método incluye una etapa de medición del contenido o los patrones de alta manosa en uno o más de los casos siguientes: antes y/o después de la manipulación, durante el cultivo de las células, después de la cosecha de las células, después de la purificación de la glicoproteína.
- En cierto caso, el método incluye una etapa para determinar un nivel deseado u objetivo de contenido de alta

manosa antes de la manipulación. El nivel objetivo o deseado puede ser, por ejemplo, >20%, >30%, >40%. El nivel objetivo o deseado puede ser, por ejemplo, <20%, <15%, <10%, <8%, <7%, <6%, <5%, <4%, <3%, <2%, <1%, <0,5%. El nivel objetivo o deseado puede ser, por ejemplo, niveles enriquecidos o aumentados de Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 o Man9. Esta determinación puede incluir, a modo no taxativo, la medición de niveles de alta manosa en un compuesto de referencia, o puede determinarse en función de una consideración estructural o biológica deseada o mediante consulta de bibliografía.

5

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La Figura 1 es una representación de la vía para la biosíntesis de alta manosa y glicanos complejos. Los monosacáridos que componen el N-glicano se ilustran de la siguiente manera: fucosa (triángulo gris claro), GlcNAc (cuadrado negro), manosa (círculo gris oscuro) y galactosa (círculo gris claro). Las estructuras que representan las especies de alta manosa se indican como HM9, HM8, etc.

15 La Figura 2 es un grupo de perfiles de LC de glicanos cosechados a partir de una línea celular de tipo salvaje (CHO) y una línea celular mutante Lec1 (MGAT1 nulo).

La Figura 3 es un conjunto de representaciones gráficas que reflejan los niveles de glicanos modelados para reflejar los niveles variables de MGAT1. Cada representación gráfica refiere al nivel del glicano indicado (% de inicio) basándose en el nivel de expresión de MGAT1 (% de inicio). Estas ilustran que una elevación en las estructuras de alta manosa no requiere una supresión completa de la transferasa de MGAT1.

20 La Figura 4 es un grupo de representaciones gráficas que muestran un análisis lineal de la expresión del gen UGP-2 en una población celular según se correlaciona con el contenido de Man5 en una glicoproteína producida por la célula. Cada punto en esta representación gráfica indica un clon específico de una de las cuatro líneas celulares transformadas enumeradas.

25 La Figura 5 es una representación gráfica de los niveles crecientes de MnCl<sub>2</sub> frente a los niveles (% de glicanos totales) de Man5. Los datos representan determinantes duplicados.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### Definiciones

30 El término "alta manosa", tal como se usa en la presente, se refiere a una o un múltiplo de estructuras de N-glicanos, incluidas HM4, HM5, HM6, HM7, HM8 y HM9, que contienen 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de manosa, respectivamente. De manera alternativa, estas pueden denominarse Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y Man9. Estas estructuras se ilustran en la Figura 1, según se indica.

35 Una "preparación de células", tal como se usa en la presente, se refiere a una preparación de células *in vitro*. En el caso de células de organismos multicelulares (por ejemplo, vegetales y animales), una preparación purificada de células es un subgrupo de células obtenido del organismo, no el organismo intacto completo. En el caso de microorganismos unicelulares (por ejemplo, células cultivadas y células microbianas), consiste en una preparación de al menos un 10% y más preferentemente el 50% de las células objeto.

40 El término "diseñada genéticamente", tal como se usa en la presente en referencia a células, pretende comprender las células que expresan un producto génico en particular tras la introducción de una molécula de ADN heterólogo en la célula. El ADN heterólogo puede ser una secuencia que codifica el producto génico y/o incluye elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia de codificación (por ejemplo, de una secuencia endógena) para el producto génico. La molécula de ADN puede introducirse mediante reconocimiento génico o recombinación homóloga, esto es, introducción de la molécula de ADN en un sitio genómico específico.

Se hace referencia al documento WO 2008/128227. Varios aspectos de la divulgación se describen en más detalle a continuación.

##### 45 Células huésped/células diseñadas genéticamente

Una célula huésped utilizada para producir una glicoproteína descrita en la presente puede ser cualquier célula que contenga la maquinaria celular para producir estructuras de alta manosa. Por ejemplo, células de insectos, células vegetales, levadura o células de mamíferos (tales como células murinas, humanas o CHO). Las células CHO que son útiles como células huésped incluyen células de cualquier cadena de CHO, incluidas CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO-S, CHO P12 o la línea celular dhfr-CHO DUK-BII (Chassin et al., PNAS 77, 1980, 4216-4220). Las células murinas que son útiles como células huésped incluyen cadenas de NS0 u otros tipos de células de hibridoma o células de roedores similares de BHK. Las células humanas que son útiles como células huésped incluyen cadenas de PerC6, células de hibridoma o células retinianas, entre otras.

50

Las células adecuadas de mamíferos incluyen cualquier célula animal o humana normal mortal o normal o inmortal anormal, incluidas: línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de células de riñón embrionarias humanas (293) (Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); ovario de hámster chino (CHO), por ejemplo, DG44, DUKX-V11, GS-CHO (ATCC CCL 61, CRL 9096, CRL 1793 y CRL 9618); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243 251 (1980)), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL 1587), células humanas de carcinoma cervical (HeLa, ATCC CCL 2), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humanas (W138, ATCC CCL 75), células de hígado humanas (Hep G2, HB 8065), células de melanoma de ratón (NSO), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI (Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44 46 (1982)), células de riñón canino (MDCK) (ATCC CCL 34 y CRL 6253), HEK 293 (ATCC CRL 1573), células WI-38 (ATCC CCL 75) (ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Md.), células MCF-7, células MDA-MB-438, células U87, células A127, células HL60, células A549, células SP10, células DOX, células SHSY5Y, células Jurkat, células BCP-1, células GH3, células 9L, células MC3T3, células C3H-10T1/2, células NIH-3T3 y células C6/36. El uso de cultivo de células de tejido de mamíferos para expresar polipéptidos se discute en general en Winnacker, FROM GENES TO CLONES (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987).

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

Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

Los métodos para generar o utilizar células huésped de la divulgación y para generar glicoproteínas terapéuticas en dichas células huésped son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los métodos se proporcionan en Current Protocols in Cell Biology (2007, John Wiley and Sons, Inc., Print ISSN: 1934-2500); Current Protocols in Protein Science (2007, John Wiley and Sons, Inc., Print ISSN: 1934-3655); Wurm, *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells* (2004) *Nature Biotech.* 22:1393-1398; Therapeutic Proteins: Methods and Protocols, Smales and James, eds. (2005, Humana Press, ISBN-10: 1588293904).

#### Métodos para detectar actividad o expresión de genes

Los métodos de detección basados en ácido nucleico abarcan ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, a modo no taxativo, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de polimerasa (por ejemplo, PCR cuantitativa), análisis SAGE, matrices de sonda o matrices de oligonucleótidos. Las sondas útiles en dichos métodos se seleccionan normalmente de secuencias de genes conocidas. En algunos casos, el material celular de una especie (por ejemplo, una especie de roedores, como el hámster chino) puede evaluarse utilizando sondas identificadas a partir de secuencias de genes ortólogos (por ejemplo, secuencias derivadas de ratas o ratones) encontradas en la técnica.

Las técnicas basadas en anticuerpos para la detección de proteínas incluyen ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayos (RIA), análisis por Western blot y resonancia de plasmón superficial. Otros métodos pueden incluir la detección de péptidos o fragmentos de estos mediante el uso de métodos basados en electrometría de masas, incluidos, a modo no taxativo, LC-MS, MS/MS, MS/MS/MS, MALDI-MS, monitoreo de reacción múltiple (MRM).

En un caso, los métodos de detección descritos en la presente son parte de la determinación de un perfil de expresión génica de la muestra, en donde el perfil incluye un valor que representa el nivel de una expresión génica, entre al menos otro valor para la expresión de al menos otro gen. El método también puede incluir la comparación del valor o el perfil (por ejemplo, múltiples valores) con un valor de referencia o un perfil de referencia. El perfil de expresión génica de la muestra puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente (por ejemplo, suministrando un ácido nucleico de la muestra y poniendo en contacto el ácido nucleico con una matriz). El método puede utilizarse para evaluar o examinar células CHO.

En otro aspecto, la divulgación presenta un medio informático que tiene una pluralidad de registros de datos codificados digitalmente. Cada registro de datos incluye un valor que representa el nivel de expresión de un gen en una muestra y un término descriptivo de la muestra. El término descriptivo de la muestra puede ser un identificador de la muestra, por ejemplo, el tipo de célula de la que derivó la muestra (por ejemplo una cadena de células CHO) o una condición de cultivo celular en la que se cultivó la célula que es la fuente de la muestra. En un caso, el registro de datos también incluye valores que representan el nivel de expresión de genes diferente de Ggta1 (por ejemplo, otros genes asociados a síntesis de glicanos u otros genes en una matriz). El registro de datos puede estructurarse como una tabla, por ejemplo, una tabla que sea parte de una base de datos como una base de datos relacional (por ejemplo, una base de datos SQL de los entornos de bases de datos Oracle o Sybase).

Métodos de modulación de la expresión génica

En ciertos métodos de la divulgación, la expresión génica se modula, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Dichos métodos pueden incluir la reducción (disminución) o la supresión (desactivación) de la expresión de un gen objeto. Los métodos de generación y uso de moléculas antisentido para modular las actividades biológicas se conocen en la técnica, véase por ejemplo: Pan and Clawson, Antisense applications for biological control (2006) J. Cell Biochem. 98(1):14-35; Sioud and Iversen, Ribozymes, DNazymes and small interfering RNAs as therapeutics (2005) Curr Drug Targets 6(6):647-53; Bhindi et al., Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies (2007) Am J Pathol. 171(4):1079-88. Los métodos para realizar desactivaciones de genes se conocen en la técnica, por ejemplo, véase Kuhn and Wurst (Eds.) Gene Knockout Protocols (Methods in Molecular Biology) Humana Pres (27 de marzo de 2009).

En algunos casos puede seleccionarse una célula que ha sido diseñada genéticamente para desactivación permanente o regulada de un gen que codifica una proteína involucrada en la síntesis de un glicano específico, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, pueden desactivarse genes que codifican una enzima, tales como las enzimas descritas en la presente. La desactivación permanente o regulada de la expresión génica puede lograrse apuntando hacia un gen locus con un constructo de ADN plásmido transfectado o un oligonucleótido sintético. El constructo de plásmido u oligonucleótido puede designarse de distintas maneras. Estas incluyen los siguientes: 1) inserción de genes marcadores seleccionables u otras secuencias dentro de un exón del gen que se está desactivando, 2) inserción de secuencias exógenas en regiones reguladoras de la secuencia no codificadora, 3) eliminación o reemplazo de secuencias reguladoras y/o codificadoras y 4) alteración de una secuencia de codificación de proteínas mediante mutagénesis específica del sitio.

En el caso de inserción de un gen marcador seleccionable en la secuencia codificadora, es posible crear una fusión en el marco de un exón endógeno del gen con el exón diseñado para contener, por ejemplo, un gen marcador seleccionable. De esta manera, tras un reconocimiento correcto, el gen endógeno expresa un ARNm de fusión (secuencia de ácido nucleico más secuencia de marcador seleccionable). Asimismo, el ARNm de fusión no sería capaz de producir un producto de traducción funcional.

En el caso de inserción de secuencias de ADN en regiones reguladoras, la transcripción de un gen puede silenciarse mediante interrupción de la región del promotor endógeno o cualquier otra región en la región 5' sin traducir (5' UTR) que se necesita para la transcripción. Dichas regiones incluyen, por ejemplo, regiones de control trasnacional y donantes de empalmes de intrones. En segundo lugar, puede insertarse una nueva secuencia reguladora cadena arriba en el gen, que haría que el gen quedara sujeto al control de factores extracelulares. De esta manera, sería posible regular hacia abajo o extinguir la expresión génica según se desee para la producción de glicoproteínas. Asimismo, una secuencia que incluye un marcador y un promotor seleccionables puede utilizarse para interrumpir la expresión de la secuencia endógena. Finalmente, todo el gen endógeno o una parte de dicho gen podría eliminarse mediante un diseño adecuado de sustratos de reconocimiento.

Otros métodos para afectar la expresión génica, por ejemplo, aumento o reducción de la expresión génica, pueden involucrar adición de agentes, por ejemplo, adición de agentes especificados a los medios de cultivo tal como se describe en la presente.

Biología de las estructuras de alta manosa

Se conoce que la presencia de glicanos que contienen manosa en proteínas tiene un efecto en la interacción de estas proteínas con varios receptores y parejas de unión, mediante la cual se influye en la función, la distribución y la estabilidad de estas proteínas que contienen manosa. Dichas parejas de unión incluyen receptores Fc, FcRn, lectinas de unión de manosa (MBL), C1q, receptor de manosa, DC y L-sign y receptores en células específicas (véase, por ejemplo, Li et al., (2009) Curr Opin Biotechnol. 20, 678-684). De esta forma, los métodos descritos en la presente son útiles para evaluar o modular el direccionamiento de glicoproteínas a tejidos específicos (por ejemplo, médula ósea, epitelios mamarios, epitelios intestinales), a tipos de células específicos (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos) o compartimentos específicos (por ejemplo, lisosoma). Los métodos descritos en la presente también son útiles para evaluar o modular la actividad biológica a través de uniones de receptores (por ejemplo, receptores Fc), eliminación/semividas de suero (por ejemplo, mediante unión al receptor de manosa, FcRn) y absorción.

Los métodos descritos en la presente también son útiles para evaluar o modular otras actividades biológicas, incluidas: la deposición y acumulación de anticuerpos. La estructura de glicanos en la porción Fc de un anticuerpo cambia la estructura tridimensional del anticuerpo. Se conoce que las alteraciones en la estructura de anticuerpos tienen el potencial de causar acumulación o deposición de anticuerpos. Los métodos utilizados en la presente serían útiles para generar anticuerpos con niveles dirigidos de alta manosa a fin de disminuir la deposición de sueros, la formación compleja y la acumulación de anticuerpos. De manera similar, estos cambios estructurales pueden utilizarse para aumentar o disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo.

En algunos casos, las moléculas de anticuerpos también pueden contener glicosilación en la porción Fab de la molécula. En estos casos, además los aspectos biológicos descritos anteriormente, la presencia de una estructura

de alta manosa también puede alterar la afinidad de los epítomos o la capacidad del anticuerpo para formar complejos reticulados en la superficie celular. Los métodos descritos en la presente serían útiles para generar anticuerpos con niveles alterados de estructuras de alta manosa a fin de “marcar” la afinidad deseada, así como para lograr un nivel deseado de reticulación de receptores para disminuir los efectos objetivo y aumentar la ventana terapéutica. Además, el diseño de polipéptidos y péptidos que contengan alta manosa puede inhibir la degradación de proteínas a través de una vía mediada por ubiquitina ligasa.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

La presente invención también se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de manera taxativa.

### EJEMPLOS

#### Ejemplo 1: análisis de alto rendimiento de glicofomas de proteínas de alta manosa

Uno de los mayores desafíos para caracterizar glicofomas de baja abundancia en una mezcla es la presencia de glicofomas de abundancia más alta, así como la amplia gama de glicofomas en la mezcla. El análisis de glicofomas de baja abundancia típicamente involucra la liberación de glicanos desde la proteína, ya sea mediante tratamiento enzimático (PNGase-F o Endo-H) o químico (es decir, hidracinólisis). Los glicanos liberados se purifican y posteriormente se analizan sin derivatización adicional o después del etiquetado con diferentes cromóforos/fluoróforos. No obstante, las etapas laboriosas de preparación de la muestra involucradas en este proceso, así como la gran cantidad de material que se necesita para estos análisis, dificulta la capacidad de usar estos tipos de método en un escenario de alto rendimiento.

El método descrito en la presente es útil para analizar glicofomas que contienen alta manosa y, en particular, glicofomas de alta manosa presentes en baja abundancia (por ejemplo, <10%, <5%, <4%, <3%, <2%, <1%, <0,05%).

Al comenzar con una muestra que contiene glicoproteínas, tal como una muestra de anticuerpos (por ejemplo, de cualquier medio, o una preparación de proteínas), realizar de manera opcional un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con digestión enzimática de la etapa 2 y/o análisis de espectrometría de masas de la etapa 3. Esta etapa es opcional en función de la formulación de la muestra o el método cromatográfico de la etapa 3. Tratar la muestra de glicoproteínas con una enzima que escinda glicanos fucosilados complejos de la glicoproteína en la muestra (por ejemplo, endoglicosidasa F3 (<http://glycotools.gabio.com/s.nl/it.A/id.96/f>)). Esta etapa revela inesperadamente glicofomas de baja abundancia, tales como especies de alta manosa, en la muestra restante. En la próxima etapa, de manera opcional, reducir y alquilar la muestra y/o realizar un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con MS. En la próxima etapa, analizar la muestra tratada enzimáticamente mediante un análisis de LC-MS de fase inversa o LC-MS de fase inversa dirigida para identificar glicofomas que contienen alta manosa. También pueden emplearse otros tipos de productos químicos en columna. Al conocer las masas teóricas de las glicofomas que contienen alta manosa, puede establecerse un experimento de MS dirigido para monitorear únicamente conjuntos seleccionados de firmas m/z correspondientes a esas especies. Este análisis puede repetirse con varias muestras en un escenario de análisis comparativo.

El método descrito anteriormente proporciona un equilibrio excelente entre rendimiento, resolución y sensibilidad, lo que lo hace particularmente adecuado para el análisis de glicofomas de baja abundancia que contienen alta manosa en un escenario de alto rendimiento.

#### Ejemplo 2: efecto de niveles de MGAT1 en estructuras de Man5

Se transformaron líneas celulares de tipo salvaje CHO (WT) y Lec1 (MGAT1 nulo) de manera estable para expresar una proteína de fusión modelo de IgG. El producto recombinante se cosechó a partir de las células y los N-glicanos se analizaron mediante LC/MS de amida. Los datos de LC de células CHO WT (superior) y con deficiencia de MGAT1 (inferior) con glicanos representativos identificados con porcentaje relativo se muestran en la Figura 2. Tal como puede verse en la Figura 2, la glicoproteína producida a partir de las células mutantes Lec1 carece de estructuras de Man5.

No obstante, se ha descubierto que no es necesaria la inhibición completa de MGAT1 para producir este efecto. La Figura 3 es un conjunto de representaciones gráficas que reflejan los niveles de glicanos modelados para reflejar los niveles variables de MGAT1. Cada representación gráfica refiere al nivel del glicano indicado (% de inicio) basándose en el nivel de expresión de MGAT1 (% de inicio). Estas ilustran que una elevación en las estructuras de alta manosa no requiere supresión o agotamiento completo de la transferasa de MGAT1.

#### Ejemplo 3: identificación de correlaciones no lineales relacionadas con contenido de alta manosa

Este ejemplo ilustra la identificación de correlaciones inesperadas y no lineales entre reguladores de glicosilación y

contenido de alta manosa.

5 Se generaron clones transformados establemente que expresaban la proteína de fusión modelo de IgG a partir de cada una de las línea celulares CHOK1, CHOS, DG44 y Dhfr-. El producto de IgG se aisló de cada clon y los glicanos se caracterizaron por 2D LC/MS. El nivel de Man5 se determinó como un porcentaje del total de glicanos. De manera simultánea, se extrajo ARNm de cada clon y se caracterizaron los niveles de distintas enzimas involucradas en aspectos dispares de síntesis de glúcidos. Dichas enzimas incluyen glicosiltransferasas, transportadores, enzimas metabólicas y otras involucradas en la biosíntesis de glicanos. Estos datos estuvieron sujetos a análisis lineal para identificar relaciones entre etapas biosintéticas particulares y el contenido de Man5. La Figura 4A muestra el nivel de expresión génica de UGP-2 dado que muestra inesperadamente una correlación lineal con el contenido de Man5 en una glicoproteína producida por la célula. Sin restringirse a la teoría, la Figura 4B ilustra cómo este gen puede, retrospectivamente, estar correlacionado con metabolitos involucrados en la biosíntesis de Man5.

#### Ejemplo 4: niveles de Man5 afectados por altas concentraciones de cationes divalentes

Este ejemplo ilustra el efecto inhibitorio de niveles elevados de cationes divalentes en la actividad de glicoenzimas.

15 Se cultivaron células CHO que expresaban una proteína de fusión modelo de IgG en presencia de niveles crecientes de  $MnCl_2$ . El producto se cosechó a partir de estas células después de 5 días, se purificó y estuvo sujeto a análisis de N-glicanos mediante HPLC de fase normal. Se cuantificaron los niveles (% de glicanos totales) de Man5, según se muestran en la Figura 5. Como puede verse, debido a que los niveles de Mn en los medios son elevados, existe un aumento concomitante en el contenido de alta manosa. Sin restringirse a la teoría, este puede estar impulsado principalmente por la actividad del cofactor Mn en las transferasas.

#### Extensiones y alternativas

25 En caso de que una o más de las bibliografías o materiales similares citados difieran de esta solicitud o la contradigan, incluidos, a modo no taxativo, los términos definidos, los términos de uso, las técnicas descritas o similares, prevalecerá esta solicitud. Los títulos de secciones utilizados en la presente se incluyen únicamente con fines de organización y no deben interpretarse como una limitación al objeto descrito de ninguna manera. Si bien los métodos se han descrito junto con diferentes realizaciones y ejemplos, no se pretende que dichos métodos se limiten a dichas realizaciones o dichos ejemplos. Por el contrario, los métodos abarcan diferentes alternativas, modificaciones y equivalentes dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, tal como lo apreciarán los expertos en la técnica.

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cuantificar glicofomas que contienen alta manosa en una muestra de glicoproteínas, incluyendo el método: (a) suministro de una muestra de glicoproteínas la cual comprende glicofomas que contienen glicanos de alta manosa, donde los glicanos de alta manosa están presentes con una abundancia de menos del 20% en relación con la masa total de glicanos de la muestra de glicoproteínas;
- (b) tratamiento de la muestra de glicoproteínas con Endoglicosidasa F3; y
- (c) cuantificación de las glicofomas que contienen alta manosa en la muestra tratada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (c) abarca la realización de electroforesis capilar (CE), LC-MS de fase inversa o LC-MS de fase inversa dirigida en la muestra tratada.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 que adicionalmente comprende la determinación de uno o más de los siguientes:
- (i) la cantidad de glicofomas de alta manosa en la muestra de glicoproteínas en relación con el total de glicofomas;
- 15 (ii) una o más relaciones relativas de dos especies de alta manosa seleccionadas de Man4, Man5, Man6, Man7, Man8 y Man9 en la muestra de glicoproteínas;
- (iii) la relación relativa de alta manosa con respecto a estructuras híbridas en la muestra de glicoproteínas;
- (iv) la relación relativa de alta manosa con respecto a estructuras complejas en la muestra de glicoproteínas;
- 20 (v) la relación relativa de alta manosa con respecto a estructuras fucosiladas en la muestra de glicoproteínas;
- (vi) la presencia o la abundancia de estructuras de alta manosa modificadas (por ejemplo, la presencia o la abundancia de estructuras de alta manosa fucosiladas) en la muestra de glicoproteínas.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde el método comprende la determinación de la presencia o abundancia de estructuras de alta manosa modificadas en la muestra de glicoproteínas y en donde las estructuras de alta manosa modificadas son estructuras de alta manosa fucosiladas.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el método identifica y/o cuantifica de manera separada al menos dos glicofomas individuales en la muestra de glicoproteínas.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la glicoproteína es una preparación de anticuerpos o una preparación de fusión de un receptor Fc.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en donde el método se realiza en condiciones de GMP.
8. El método de la reivindicación 1, que incluye además la comparación de la identidad o la cantidad cuantificada de glicofomas de alta manosa con un nivel de referencia o criterio de calidad.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el nivel de referencia es el de una muestra de control, un estándar de GMP o un estándar farmacéutico.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, que además comprende entre las etapas (a) y (b) una etapa de realización en la muestra de glicoproteínas de un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con la digestión enzimática y/o análisis de espectrometría de masas (MS).
- 40 11. El método de la reivindicación 1, que comprende además entre las etapas (b) y (c), una etapa de reducción y alquilación de la muestra tratada y/o realización en la muestra tratada de un intercambio de solución amortiguadora por una solución amortiguadora compatible con la espectrometría de masas.
12. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de glicoproteínas comprende una glicoproteína terapéutica.

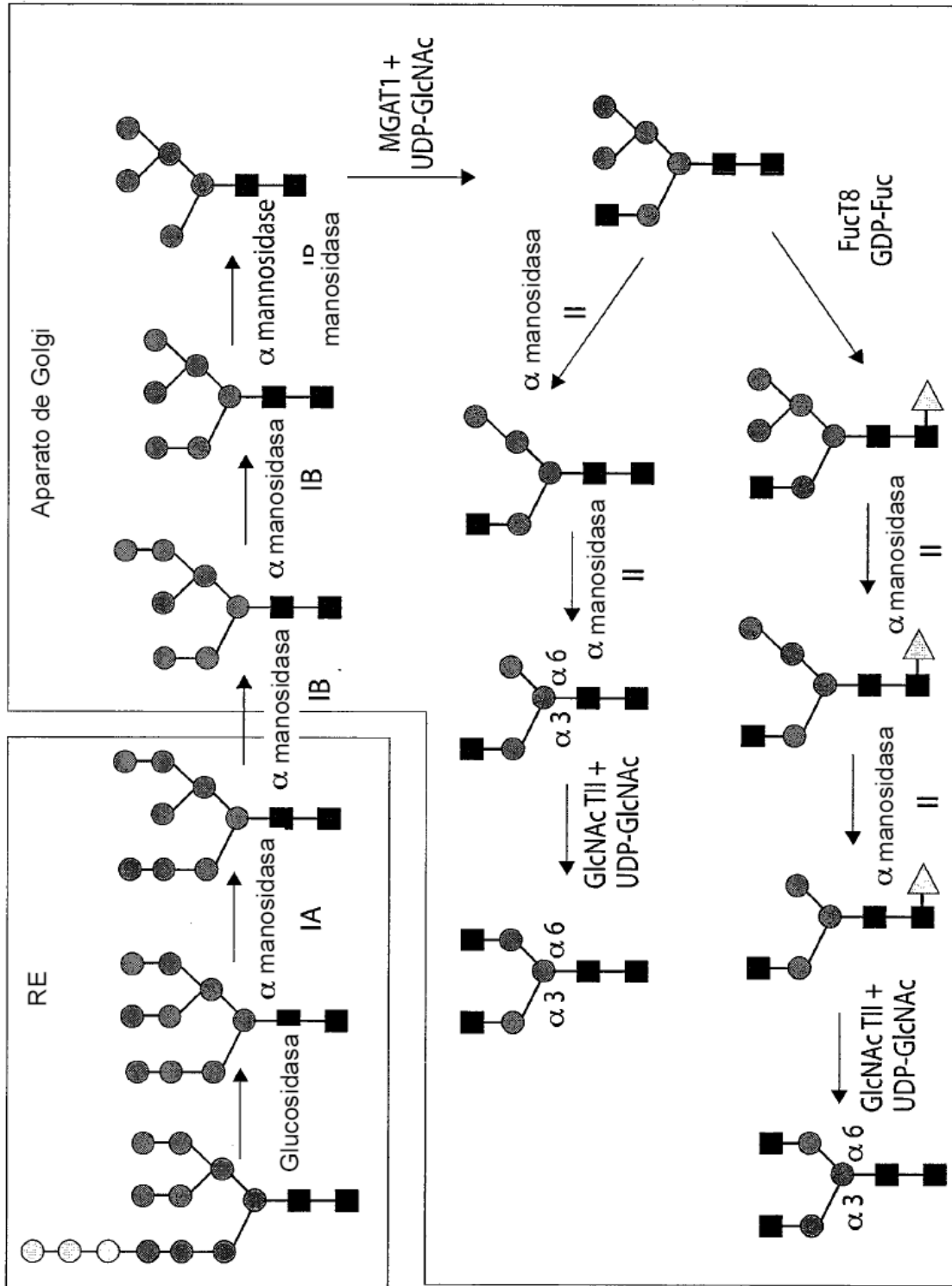


Fig. 1



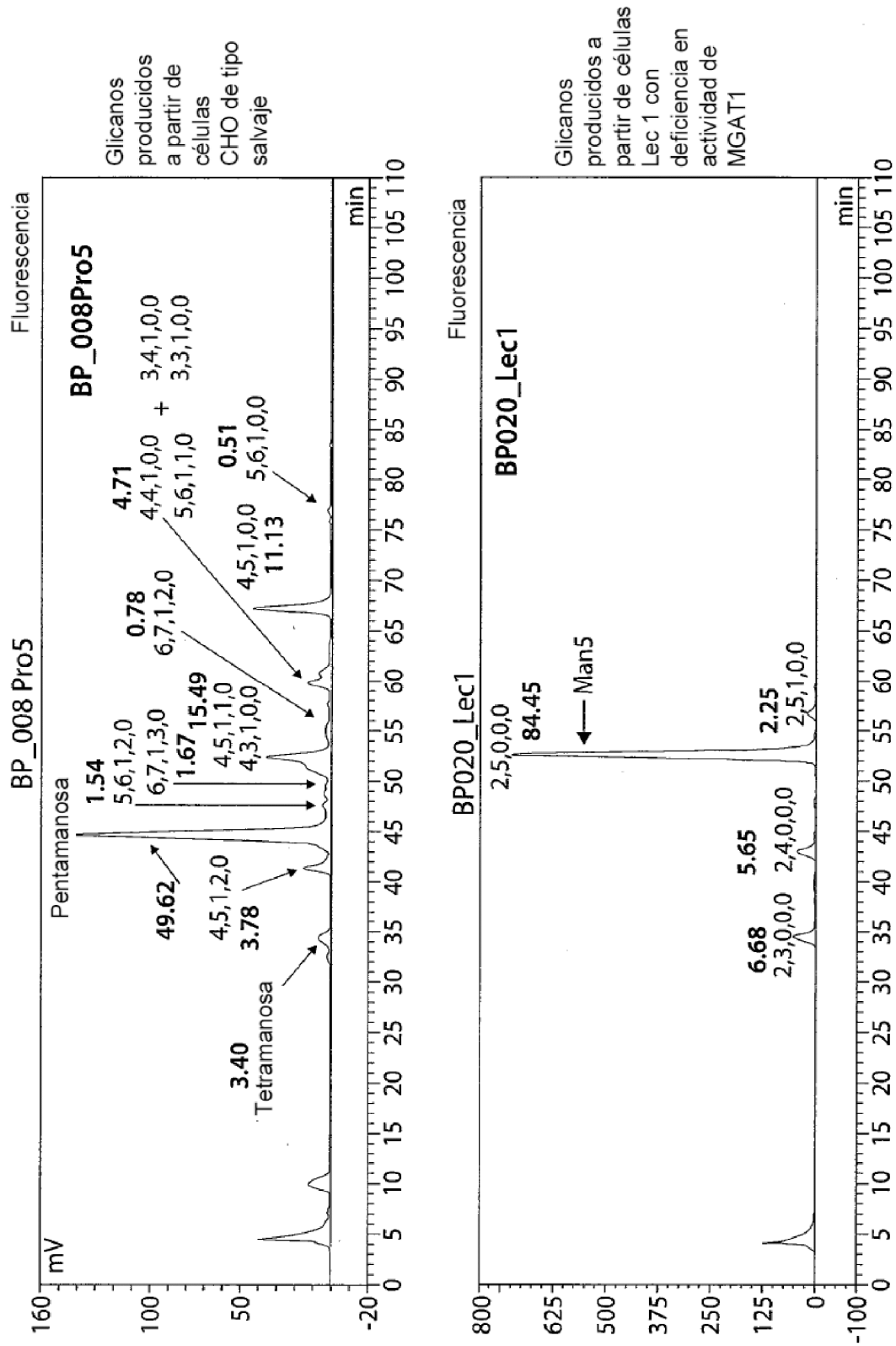


Fig. 2

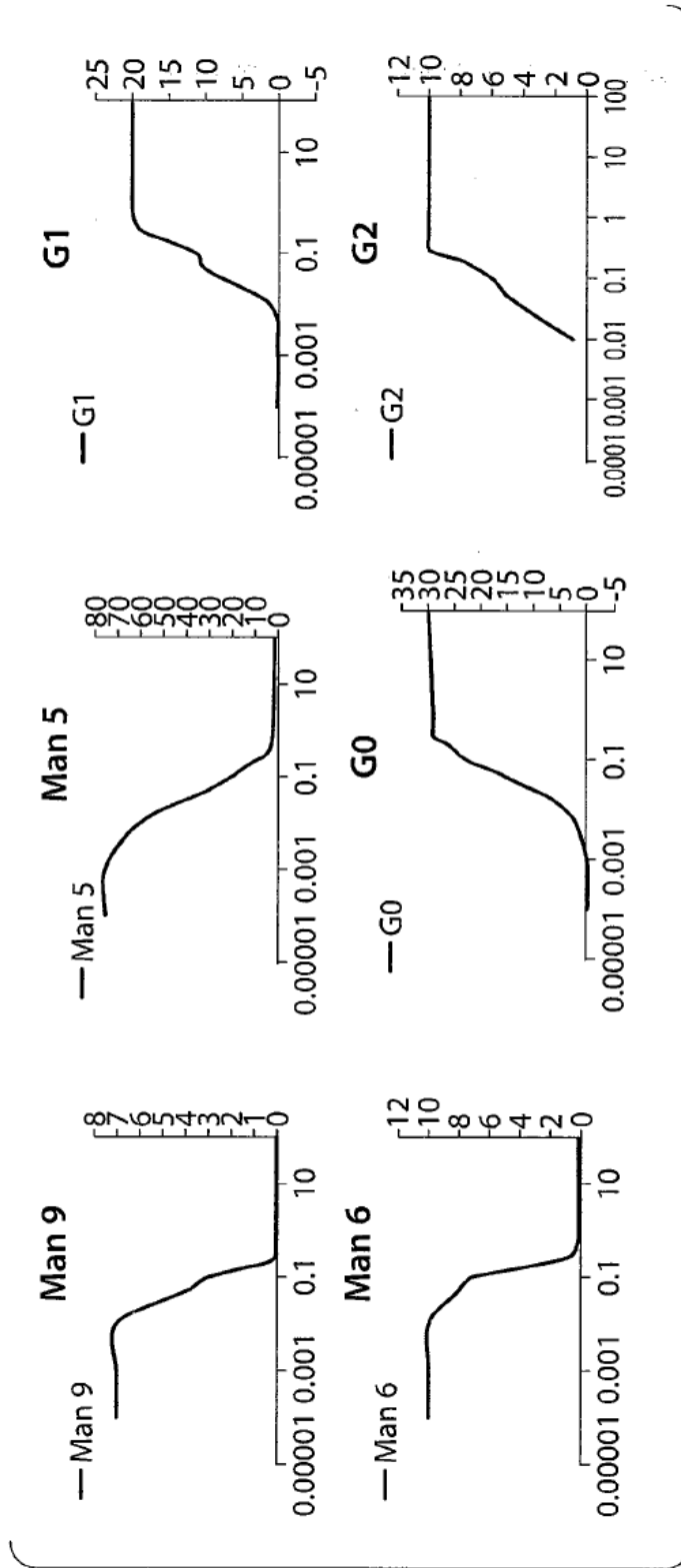


Fig. 3

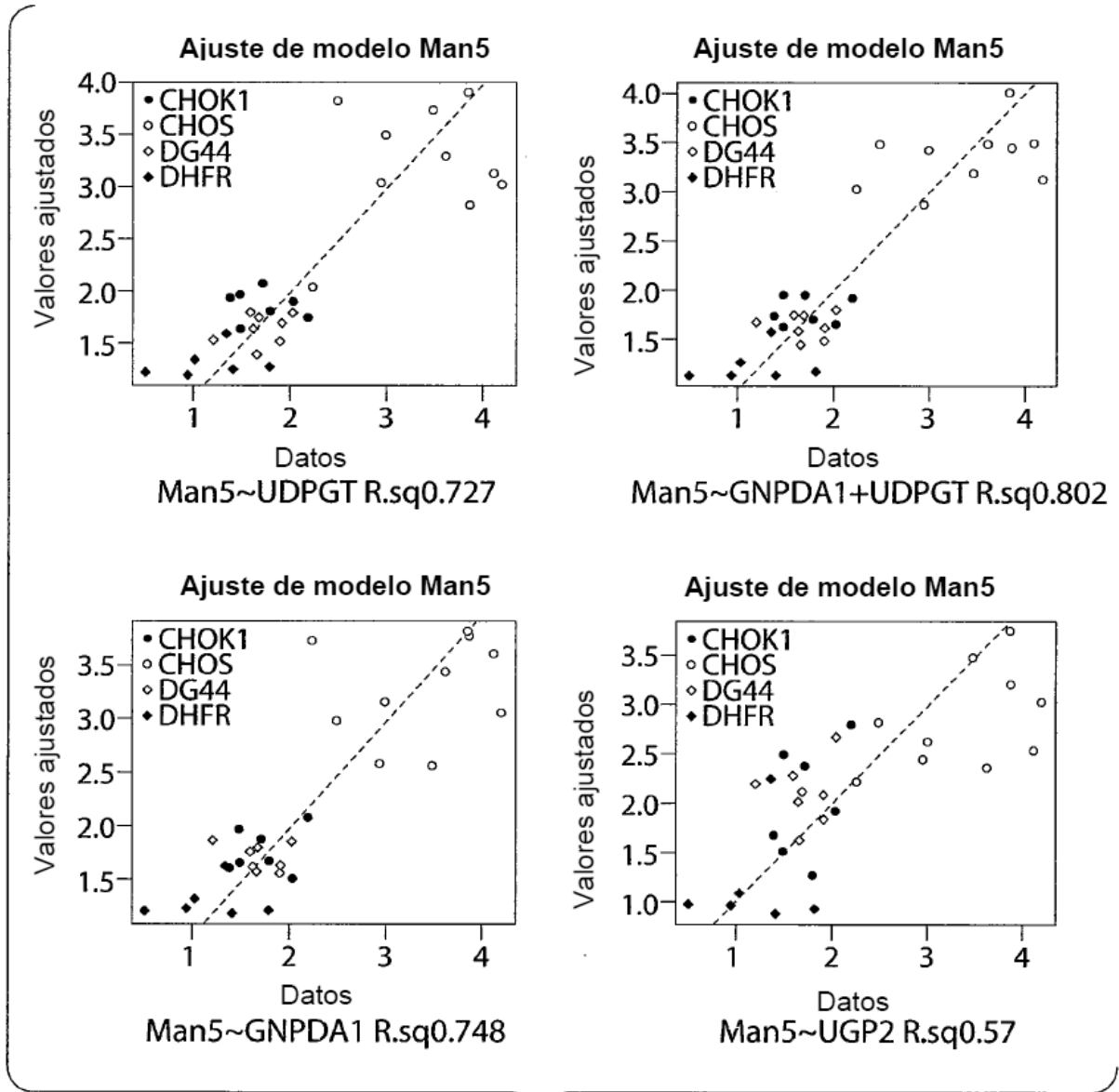


Fig. 4A

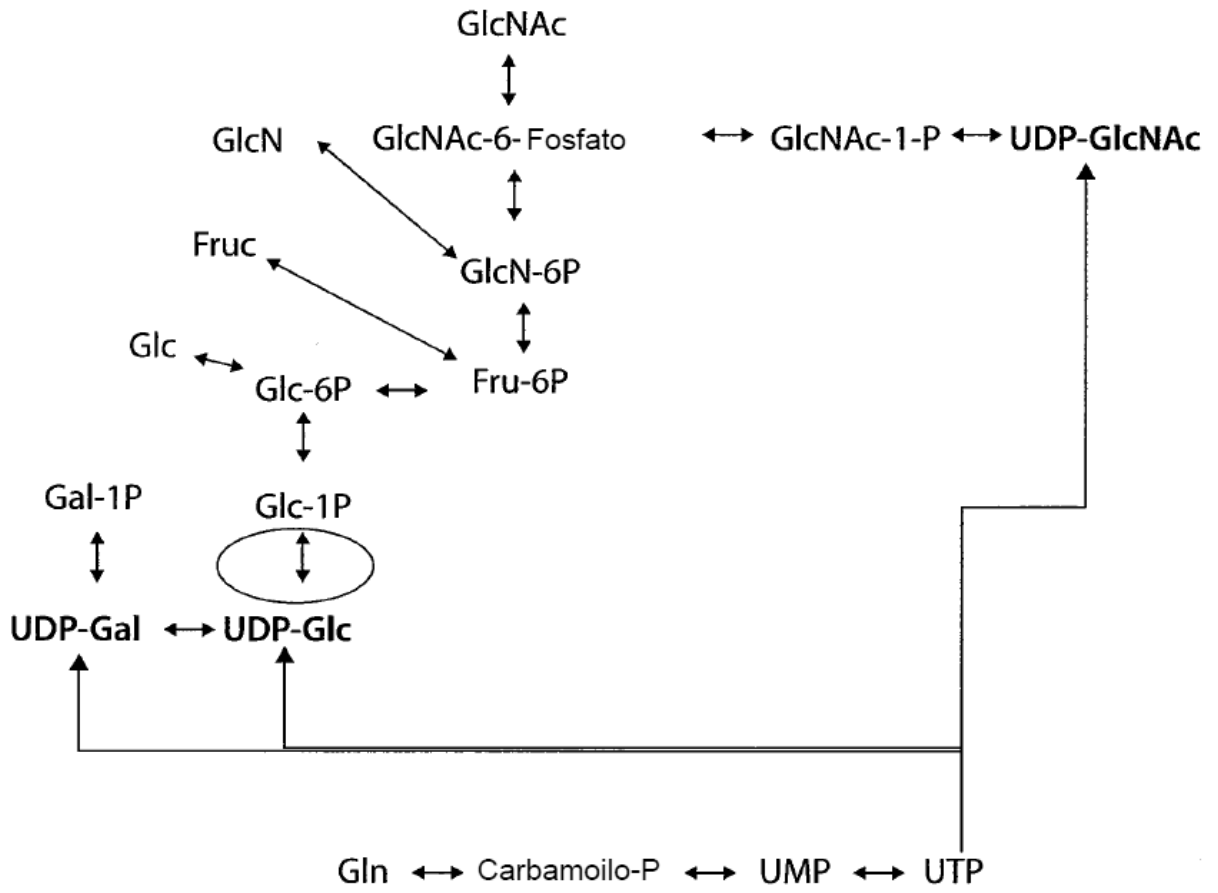
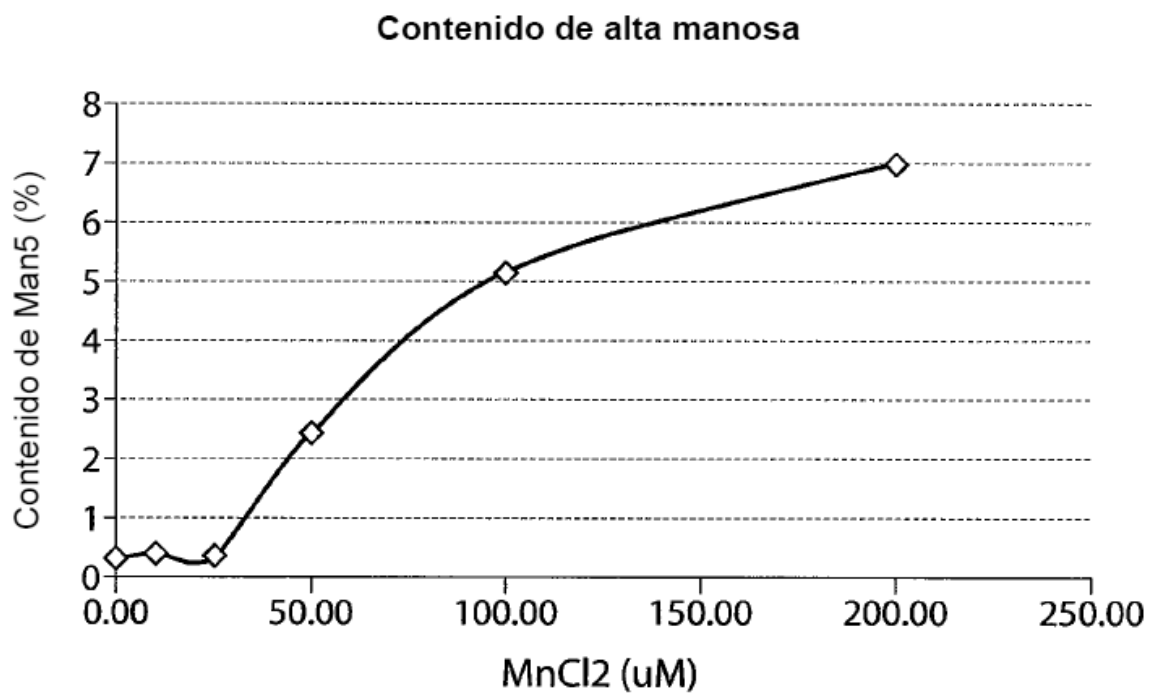


Fig. 4B



**Fig. 5**