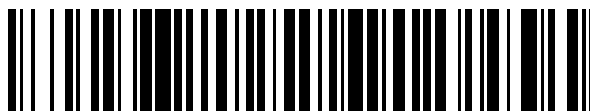


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 261**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)
C07K 14/59	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 11176197 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2428224**

54 Título: **Uso de células humanas de origen leucémico mieloide para expresión de anticuerpos**

30 Prioridad:

10.09.2006 EP 06090162
18.09.2006 EP 06090171
13.10.2006 EP 06090190
04.05.2007 EP 07090094

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2017

73 Titular/es:

GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

72 Inventor/es:

GOLETZ, STEFFEN;
DANIELCZYK, ANTJE;
BAUMEISTER, HANS;
STAHN, RENATE;
LÖFFLER, ANJA y
STÖCKL, LARS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 261 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

Uso de células humanas de origen leucémico mieloide para expresión de anticuerpos

5 **COMPENDIO**

La invención proporciona métodos biotecnológicamente favorables para la producción de composiciones moleculares de proteínas y en particular composiciones moleculares de anticuerpos que tienen actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y una glicosilación humana. Proporciona además métodos para seleccionar células huésped para producir composiciones moleculares de proteínas.

10

INTRODUCCIÓN

Un rasgo y desafío clave para la industria es la producción de proteínas recombinantes, y la productividad, coste, homogeneidad y actividad de proteína son elementos clave que quedan por optimizar. La glicosilación es también un elemento clave en la producción de altos rendimientos de glicoproteínas recombinantes homogéneas que plantea una serie de problemas críticos para su producción. Cada línea celular de producción actual ofrece una serie de diferentes desafíos y problemas que son debidos en gran medida a la complejidad y la especie, tejido y especificidad al sitio de la glicosilación. Por lo tanto, la optimización de los sistemas de producción con respecto a la glicosilación sigue siendo uno de los aspectos claves para optimización. Esta particularmente, ya que las diferencias en el patrón de glicosilación tienen a menudo un impacto considerable en la actividad, inmunogenicidad, biodisponibilidad y semivida de las moléculas de proteína. Se da una visión de conjunto detallada de propiedades de la glicosilación de diferentes líneas celulares derivadas de diferentes especies y sistemas de producción no mamíferos en Jenkins et al (Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry, Nat Biotechnology, 1996, 14: 975-981).

15

20

25

30

Los anticuerpos son grandes herramientas para diagnosis e investigación, y probablemente llegarán a ser la familia más grande de terapéuticos. Están en el mercado más de diez terapéuticos de anticuerpos recombinantes, y cientos en desarrollo clínico. Un rasgo y desafío clave para la industria es la producción de anticuerpos recombinantes ("rMAbs"), y la productividad, coste, homogeneidad y actividad de anticuerpo son elementos clave que quedan por optimizar. Casi todos los rMAbs terapéuticos en el mercado han sido producidos en las líneas celulares de roedores a partir de hámster (CHO) y ratones (NS0 o Sp2/0). La gran mayoría de los rMAbs en desarrollo son producidos en células de roedores, y otros están en desarrollo, sin embargo, ninguno ha sido suficiente para optimizar la productividad, coste, homogeneidad y actividad de anticuerpo.

35

La glicosilación es también un elemento clave en la producción de altos rendimientos de rMAbs homogéneos y potentes que plantea una serie de problemas críticos para la producción de rMAbs. Cada línea celular de producción actual ofrece una serie de diferentes desafíos y problemas que son debidos en gran medida a la complejidad y la especie, tejido y especificidad al sitio de la glicosilación [Revisión: Royston Jefferis, CCE IX: Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics; Biotechnol. Prog. 2005, 21, 11-16].

40

Por lo tanto, la optimización de sistemas de producción de proteínas y en particular de anticuerpos con respecto a la glicosilación sigue siendo uno de los aspectos clave para la optimización.

45

La presente invención proporciona nuevos sistemas de expresión basados en células sanguíneas humanas inmortalizadas, y en particular basados en células de origen leucémico mieloide. Estas células mejoran sorprendentemente la producción de proteínas glicosiladas y en particular anticuerpos con respecto a actividad, rendimiento y/o homogeneidad.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

50

Las proteínas son un grupo diverso cuya función y aparición varía ampliamente de unas a otras. Entre las proteínas de potencial terapéutico, la mayoría de las proteínas están glicosiladas, tal como muchas hormonas (p.ej. hormona del crecimiento, glucagón, FSH y LH), factores de crecimiento (p.ej. GM-CSF, G-CSF, VEGF y eritropoyetina), citocinas (p.ej. IL-2, IL-7, interferón-alfa y -beta, TNF-alfa), anticoagulantes (p.ej. lepirudina, desirudina), factores de coagulación sanguínea (p.ej. factores VII, VIII y IX), vacunas (p.ej. antígeno de hepatitis B) y anticuerpos. Los sistemas celulares de producción establecidos son incapaces de producir proteínas con la glicosilación humana original. Los sistemas celulares procarióticos (p.ej. bacterias) y la mayoría de eucarióticos (p.ej. célula de levadura, insecto y planta) sintetizan proteínas que carecen de glicosilación o llevan glicanos que difieren en gran medida de las cadenas de carbohidrato humanas. Las células de ovario de hámster chino (CHO) son un sistema de producción usado comúnmente que es capaz de glicosilar proteínas de una manera similar a las células humanas. Sin embargo, siguen habiendo importantes diferencias, tales como en galactosilación, fucosilación, glicosilación particular con N-acetilglucosaminas, y especialmente en diversos aspectos de sialilación. Estas diferencias influyen en la actividad, la biodisponibilidad, la inmunogenicidad y la semivida.

60

65

En el momento en que se establecieron estos sistemas de producción, era suficiente producir proteínas terapéuticas que fueran al menos hasta cierto punto activas. Sin embargo, hoy se concentran grandes esfuerzos para mejorar la actividad de una proteína terapéutica con el objetivo de (I) reducir el número y concentración de las dosis aplicadas de las proteínas terapéuticas, (II) reducir los costes de una terapia, y (III) reducir los efectos secundarios.

La principal estrategia para mejorar la bioactividad de las proteínas es alargar su semivida en suero y por tanto su biodisponibilidad. Esto se puede hacer p.ej. mediante el procedimiento llamado PEGilación, donde ciertas formas de polietilenglicol son añadidas/enlazadas químicamente a la proteína producida. El PEG aumenta el peso molecular y por tanto la semivida en suero. Sin embargo, están asociados varios problemas con este procedimiento. Por ejemplo, en casi todos los casos la PEGilación disminuye la actividad de una proteína por su función efectora celular, la administración repetitiva en seres humanos da como resultado a menudo una respuesta inmune adversa como anticuerpos neutralizantes, y/o el procedimiento de producción necesita modificación química adicional dando como resultado un proceso multietapas con costes adicionales, pérdidas y tiempo. Existen sistemas portadores similares (p.ej. HESilación o unión de albúmina) que tienen inconvenientes comparables.

También, la modificación de las cadenas de carbohidrato y por tanto la glicosilación de proteínas es el centro de atención para mejorar la semivida en suero de proteínas expresadas de manera recombinante. Las tecnologías se centran de este modo en la maximización del grado de sialilación de una glicoproteína recombinante. Los ácidos siálicos son los monosacáridos terminales más predominantes en la superficie de las células eucarióticas, y se cree generalmente que cuanto más esté sialilada una glicoproteína más larga es su semivida en suero durante la circulación. Esto se basa en la presencia de ciertos receptores como el asialoproteína-receptor en el hígado, que se une a proteínas no sialiladas circulantes y las dirige hacia la célula para degradación.

Están presentes diversas clases de anticuerpos en el ser humano y la mayoría de los mamíferos, a saber, IgG, IgM, IgE, IgA, IgD. Aunque se usan moléculas de todas las clases de anticuerpos en diagnóstico o como herramientas de investigación, la mayoría de los terapéuticos basados en anticuerpos en el mercado y en desarrollo son IgG, y en menor medida IgM. La clase IgG humana se clasifica además en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La estructura básica de una molécula de IgG consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden dos regiones Fab, cada una con un dominio variable que comprende el sitio de unión a antígenos y un dominio constante, una región Fc que comprende más dominios constantes y los sitios de interacción para ligandos, y la región bisagra flexible que conecta las regiones Fab y Fc. Los anticuerpos pueden existir como moléculas enteras o como fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab o Fv de cadena única que comprenden las dos regiones variables de la cadena pesada y ligera conectadas por medio de un enlazador. La Fig. 18 muestra un anticuerpo IgG.

Los anticuerpos recombinantes para uso terapéutico son muy a menudo quiméricos, humanizados o las llamadas secuencias de proteína totalmente humanas, a fin de reducir su inmunogenicidad. Sin embargo, no se han conseguido fácilmente moléculas en realidad totalmente humanas dado que las modificaciones post-transcripcionales tales como particularmente la glicosilación no son humanas debido a la producción en células de roedores o CHO, y por tanto pueden diferir de las modificaciones encontradas en anticuerpos humanos en sueros humanos. Las diferencias en la modificación, en particular el patrón de glicosilación, pueden tener un serio impacto en la actividad y la inmunogenicidad del anticuerpo producido respectivamente.

La actividad de un anticuerpo puede ser debida a e influenciada por una combinación de efectos. Por una parte el anticuerpo tiene una cierta especificidad que es mediada por la región variable del anticuerpo ("región V") ubicada en la región Fab de ciertas secuencias, las regiones CDR, de la región V. Juegan un papel clave en determinar la especificidad y afinidad particulares de un anticuerpo. Las regiones V son por tanto decisivas para las características de unión al epítipo, y varían de anticuerpo a anticuerpo. La afinidad de un anticuerpo describe la fuerza y cinética de la unión de una única región de unión de un anticuerpo a su epítipo. Dado que las diversas clases y subclases de anticuerpos llevan entre dos y diez regiones variables idénticas en una molécula de anticuerpo, la fuerza y cinética de la unión de un anticuerpo es influenciada por el número de sitios de unión disponibles para unir y la accesibilidad de los epítopos en el antígeno o célula diana, y es expresada en su avidéz.

Otro factor importante para la calidad de un anticuerpo para su uso en diagnóstico y especialmente en terapia es el número de sitios de unión de un anticuerpo en su estructura o célula diana, así como su velocidad de internalización. Estas calidades influyen en los efectos e idoneidad de un anticuerpo para su uso, especialmente en terapia.

Por otra parte, los mecanismos efectoros relevantes para uso terapéutico de un anticuerpo son varios múltiples, por lo que algunos de los anticuerpos actúan por medio de sólo un mecanismo y otros por una combinación de varios mecanismos efectoros. Una estrategia es acoplar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a moléculas efectoras que median en un efecto terapéutico, tal como acoplamiento a una molécula efectora inmune, por ejemplo interleucina 2 para reclutar el sistema inmune, o acoplamiento a toxinas o radioisótopos a fin de matar células diana, por ejemplo para terapias antitumorales. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados son también valiosos para diagnóstico in vivo.

La otra estrategia es usar anticuerpos no marcados, los llamados "desnudos", que pueden tener importantes ventajas tales como menor toxicología, logística menos complicada, el uso de armas efectoras inmunes naturales o el desencadenamiento de efectos terapéuticos sin necesidad de moléculas efectoras adicionales. Se han realizado un gran número de estudios para dilucidar los mecanismos de actividad y modo de acción de anticuerpos, así como desarrollar anticuerpos usando estas actividades. Entre las actividades y efectos más importantes están la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (denominada en la presente memoria "actividad

ADCC”), la actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (denominada en la presente memoria “actividad CDC”), la actividad de citotoxicidad mediada por fagocitosis (denominada en la presente memoria “actividad de fagocitosis”), actividad mediada por un receptor (denominada en la presente memoria “actividad mediada por receptor”), que comprende un conjunto entero de diferentes efectos y actividades.

5 Las actividades mediadas por receptor están basadas principalmente en la unión del anticuerpo a una molécula o receptor en una célula diana o por el impedimento de la unión de ciertas moléculas a una célula diana, induciendo o inhibiendo de este modo ciertos efectos sobre estas células, tales como actividad antagonística o agonística o bloqueo de receptor de un anticuerpo, conduciendo por ejemplo a la inducción o inhibición de apoptosis o proliferación de células diana o a la secreción o inhibición de la secreción de ciertas moléculas en una célula diana, o bloqueo o desencadenamiento de ciertos otros eventos mediados por receptor tales como interacciones entre moléculas y células o entre células. La actividad ADCC, actividad CDC y actividad de fagocitosis son actividades citotóxicas que son mediadas por la región Fc del anticuerpo (denominadas en la presente memoria “actividades mediadas por la parte Fc”) mientras que las actividades, afinidad, avidéz y especificidad mediadas por receptor del anticuerpo son mediadas principalmente por la región enlazante del anticuerpo comprendida en la región Fab.

20 Las actividades mediadas por la parte Fc son mediadas por medio de células efectoras inmunológicas tales como células asesinas, células asesinas naturales y macrófagos activados, o diversos componentes del complemento por unión a ligandos efectoras tales como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRIII, componente Cq1 del complemento, el receptor Fc neonatal (FcRn), etc. Se reporta que la subclase IgG1 humana tiene la actividad ADCC y CDC más alta entre las moléculas de clase IgG humana. Para IgM la actividad CDC es un mecanismo efector dominante. La actividad ADCC y actividad CDC implican la unión de la región Fc, la región constante del anticuerpo, a receptores de Fc tales como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRIII de la célula efectora o componentes del complemento tales como C1q. Hay importantes residuos de aminoácidos en la región bisagra, y en particular en el segundo dominio de la región constante (“dominio Cgamma2”). Una cadena de carbohidrato que está unida a los dominios Cgamma2 es importante para la actividad. La cadena de carbohidrato está unida al aminoácido asparagina 297 (Asn-297) de Cgamma2 (cadenas de carbohidrato enlazadas por N-glicósido). El término de la cadena de carbohidrato que se une a la asparagina se llama extremo reductor, y el extremo opuesto se llama extremo no reductor. La región Fc de un anticuerpo IgG tiene dos sitios de unión con carbohidratos. La Fig. 18 muestra la estructura de una molécula de IgG e indica la posición donde se pueden encontrar típicamente estructuras de carbohidrato. Además, se explica la estructura química y composición de estas estructuras de carbohidrato.

35 De las actividades mediadas por la parte Fc, se supone que dos están influenciadas por la glicosilación del anticuerpo: se ha demostrado que la retirada de la cadena de azúcar en la parte Fc del anticuerpo da como resultado la desaparición de la actividad CDC y ADCC, y también una reducción de galactosas en estos N-glicanos causa una disminución en la actividad CDC [Boyd et al., *Molecular Immunol.*, 32, 1311, (1995); patente de EE.UU. 6.946.292]. Además, se describe que la expresión de anticuerpos en células de rata da como resultado una actividad ADCC aumentada de ciertos anticuerpos expresados en las mismas [Lifely et al., *Glycobiology*, 1995 Dec;5(8):813-22; solicitud de patente internacional WO00/61739] cuando se compara con el mismo anticuerpo expresado en células de hámster y de rata. Ambos informes suponen que los cambios en la glicosilación causan estas diferencias en la actividad ADCC del anticuerpo, sin embargo, esto no está claro. Lifely et al., 1995, supone que la N-acetilglucosamina bisectora (“bisecGlcNAc”) es responsable de una actividad ADCC aumentada del anticuerpo, mientras que la solicitud de patente internacional WO00/61739 supone que una disminución drástica de fucosa enlazada en alfa 1-6 a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de N-glicanos (“fucosa núcleo”) es responsable de una actividad ADCC aumentada. Además, se describe que la expresión recombinante de la enzima GnTIII en células CHO que es responsable de unir la bisecGlcNAc de azúcar a N-glicanos da como resultado un aumento de la actividad ADCC de ciertos anticuerpos cuando se expresan en estas células cuando se compara con el mismo anticuerpo expresado en células CHO no transfectadas de manera recombinante con GnTIII [patente de EE.UU. 6.602.684, Umana et al., *Nature Biotechnol* 17: 176-180 (1999)]. Adicionalmente, se describió que la inactivación del gen FUT8 en células CHO, que da como resultado la falta de fucosa núcleo, puede aumentar la actividad ADCC de ciertos anticuerpos cuando se expresa en tales células FUT8 KO CHO [patente de EE.UU. 6.946.292]. Estos resultados también demuestran la importancia y complejidad del patrón de glicosilación para la actividad del anticuerpo.

55 Sin embargo, un patrón de glicosilación “extraño” y por tanto no optimizado puede no sólo ser perjudicial para la actividad, también puede ser inmunogénico. Los sistemas de expresión y producción actuales para proteínas y en particular anticuerpos son principalmente líneas celulares derivadas de roedores, y están basados en líneas celulares de hámster, ratones o rata tales como CHO, BHK, NS0, Sp2/0 e YB2/0. Se sabe que las células de roedor pueden producir bajo condiciones no óptimas varios productos proteicos anormalmente glicosilados que carecen de potencia o son inmunogénicos. Además, se sabe que las células de roedor expresan estructuras de carbohidrato con importantes diferencias a las expresadas en células humanas que comprenden la presencia de azúcares no humanos y la falta de ciertos restos de azúcar humanos que pueden hacer a proteínas expresadas en estas células por ejemplo inmunogénicas, menos eficaces, de menor rendimiento o requisitos estructurales subóptimos de plegado. La mayoría de células de roedor expresan por ejemplo ácido N-glicolilneuramínico (“NeuGc”), una alternativa para el ácido N-acetilneuramínico (“NeuNAc”) no presente en seres humanos que es inmunogénico en seres humanos y/o la modificación de galactosa inmunogénica alfa(1-3) galactosa (“Gal alfa1-3Gal”), y/o carecen de

importantes carbohidratos tales como el importante NeuNAc enlazado en 2-6, o carecen de bisecGlcNAc. Hay también otras diferencias conocidas y desconocidas. Además, de la producción de roedores se sabe que los perfiles de glicofoma son mayoritariamente heterogéneos, y también el perfil de glicofoma específico a clones, que puede variar ampliamente de clon a clon en células CHO, NS0 o Sp2/0 y son dependientes del modo de producción y condiciones de cultivo.

Además, existen sistemas de producción para la producción de proteínas que incorporan células humanas, tales como p.ej. células Hek 293, que son derivadas de células de riñón embrionario humano, o el sistema celular PerC6®, que es derivado de una única célula humana derivada de la retina, que fue inmortalizada a propósito usando tecnología de ADN recombinante. Sin embargo, estas líneas celulares, si bien se prefieren a menudo sobre sistemas celulares no humanos, tienen aún algunos inconvenientes. Tienen un patrón de glicosilación único, que es atribuible a la maquinaria de glicosilación de las células respectivas. Sin embargo, dependiendo de la proteína a ser producida, podrían no entregar un perfil de glicosilación optimizado, p.ej. con respecto a la actividad y/o semivida en suero de la proteína. En particular es difícil conseguir un cierto grado y patrón de sialilación con estas células. P.ej. los sistemas celulares conocidos en el estado de la técnica a menudo no son capaces de proporcionar una sialilación enlazada en alfa 2-6 detectable, que, sin embargo, es importante para la semivida en suero.

A partir de estos hechos llega a estar claro que hay aún una necesidad de sistemas de expresión y producción que puedan optimizar adicionalmente la productividad, homogeneidad y/o actividad de anticuerpo proporcionando alternativas y/o sistemas de expresión mejorados. Además, a partir de estos hechos también llega a estar claro que no puede decirse qué estructuras de carbohidrato y especialmente qué estructuras de carbohidrato humanas son óptimas para mejorar la actividad u homogeneidad de proteínas y en particular anticuerpos, y qué tipo de patrón de glicosilación tiene que proporcionar una línea celular y especialmente una línea celular humana para optimizar la actividad de una proteína, en particular un anticuerpo. Por lo tanto, hay una necesidad de sistemas de expresión que proporcionen productos con un patrón de glicosilación divergente en comparación con los productos obtenidos con los sistemas de expresión conocidos en el estado de la técnica.

La presente invención proporciona soluciones a estos problemas proporcionando nuevos sistemas de expresión basados en líneas celulares sanguíneas inmortales humanas, y en particular células de origen leucémico mieloide. Usar células sanguíneas humanas inmortalizadas es ventajoso en comparación con los sistemas conocidos en la técnica anterior, porque estas células proporcionan un perfil de glicosilación diferente que otros sistemas celulares humanos conocidos derivados de tejido diferente (p.ej. riñón o retina). Estas diferencias pueden ser ventajosas con respecto a actividad, homogeneidad y rendimiento de producto. Además, estas células pueden ser transfectadas y cultivadas en suspensión bajo condiciones exentas de suero.

Los métodos de la invención se definen en las reivindicaciones. Por tanto, según una primera realización, se proporciona un método para seleccionar una célula huésped para producir una composición de proteína que tiene al menos uno de las siguientes características de glicosilación:

(i) tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(ii) comprende más que 35% de estructuras G2 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína; y/o

(iii) tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iv) comprende menos que 22% de estructuras G0 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína; y/o

(v) comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(vi) comprende al menos 2% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al

menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora; y/o

(vii) tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma, en donde

- tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; o

- tiene un grado de sialilación disminuido, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

mediante las siguientes etapas

(a) introducir en al menos dos células huésped diferentes que proporcionan un patrón de glicosilación divergente al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma; en donde al menos una de dichas células huésped es una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en las líneas celulares DSM ACC2858 (GT-2X), DSM ACC2806 (NM-H9D8), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de las mismas; y

(b) cultivar dichas al menos dos células huésped diferentes, en donde cada célula huésped diferente produce una composición de proteína que tiene un patrón de glicosilación divergente del patrón de glicosilación producido por la otra célula huésped;

(c) aislar dichas composiciones de proteína expresadas que llevan un patrón de glicosilación diferente de las al menos dos células huésped diferentes; y

(d) seleccionar dicha célula huésped que produce una composición de proteína que tiene al menos una de las características de glicosilación definidas en (i) a (vii).

En una segunda realización, la presente invención proporciona un método para producir una composición de proteína, que comprende

(a) realizar un método para seleccionar una célula huésped para producir una composición de proteína según el primer aspecto de la presente invención; y

(b) cultivar la célula huésped seleccionada bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína; y

(c) aislar dicha composición de proteína.

Este método que utiliza células sanguíneas humanas inmortalizadas mejora la producción de proteínas y en particular anticuerpos con respecto a actividad, rendimiento y/o homogeneidad. Esto es sorprendente, dado que hasta ahora no se había demostrado que las células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular células de leucemia mieloide son adecuadas para la producción de proteínas y particularmente conducen a anticuerpos con propiedades mejoradas respectivamente. Aunque se usó una cierta célula de leucemia de rata para la expresión de anticuerpos, la maquinaria de glicosilación entre ser humano y rata es críticamente diferente, por lo que esta última puede expresar restos de carbohidratos que pueden ser inmunogénicos en el ser humano, tales como NeuGc y Gal alfa1-3 Gal. Se describió que la célula de leucemia de rata YB2/0 da anticuerpos con actividad ADCC más alta debido a mayor presencia de biseGlcNAc o debido a una drástica regulación en descenso de fucosa núcleo.

Fue aún más sorprendente que el problema podía ser solucionado por esta invención usando células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular células mieloides, dado que se había reportado previamente que la línea celular K562 - una célula de leucemia mieloide - no expresa la enzima para biseGlcNAc, un hallazgo que fue descrito y mostrado por hibridación génica de GnTIII [Yoshimura M et al., Cancer Res. 56(2): 412-8 (1996)] y sí expresa el gen FUT8, que expresa la fucosiltransferasa que causa la adición de fucosa núcleo como se muestra por RT-PCR [ejemplo 1]. Fue sorprendente porque K562 no es resistente al tratamiento de lectina, dado que es unida fuertemente por la lectina LCA, la base para células negativas o fuertemente reguladas en descenso para fucosilación de núcleo. Debido a esta información sobre el perfil de glicosilación de células K562, no podía esperarse que esas células pudieran mejorar la actividad de anticuerpos expresados en las mismas, ya que se supuso que la maquinaria de glicosilación necesaria para un patrón de actividad favorable no estaba presente. También fue sorprendente que se pueden generar y conseguir proteínas, y en particular anticuerpos, con actividad de unión

aumentada, homogeneidad mejorada y/o rendimientos más altos con el método de producción de la presente invención en comparación con células de sistemas de expresión actuales.

5 La estrategia de la invención es generar líneas celulares humanas adecuadas a fin de conseguir un sistema que pueda proporcionar productos proteicos con un conjunto entero de modificaciones post-transcripcionales tan cercano como sea posible al sistema humano y por tanto sin o con menos propiedades inmunogénicas y/o actividad mejorada en el sistema humano. El objetivo es proporcionar un patrón de glicosilación hecho a medida para cada proteína/anticuerpo a ser expresado.

10 Debido al hecho de que las estructuras de carbohidrato son muy complejas, que la maquinaria de glicosilación de células comprende varios cientos de enzimas que están implicadas en su síntesis y que esas enzimas son principalmente especies expresadas específicas y específicas a tejidos, la principal estrategia de los inventores para conseguir una glicosilación humana es proporcionar sistemas de expresión humana biotecnológicamente adecuados para expresar proteínas y en particular anticuerpos, con un patrón de glicosilación optimizado. Como el patrón de glicosilación optimizado puede diferir de proteína a proteína y de anticuerpo a anticuerpo, la invención proporciona líneas celulares que producen diferentes patrones de glicosilación, permitiendo de este modo seleccionar la línea celular para la producción que produce un patrón de glicosilación optimizado para el producto de proteína/anticuerpo respectivo.

15 Por tanto, la invención proporciona métodos biotecnológicamente favorables para la producción de composiciones proteicas y en particular composiciones moleculares de anticuerpos que tienen actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana. Describe además nuevas células huésped, ácidos nucleicos, y composiciones moleculares.

20 Por tanto, se describe un método para producir una composición proteica, preferiblemente una composición molecular de anticuerpos, que tiene un patrón de glicosilación definido, que comprende las siguientes etapas:

- 25 (a) introducir en una célula sanguínea humana inmortalizada como célula huésped al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma;
- 30 (b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína; y
- (c) aislar dicha composición de proteína que tiene las características de glicosilación pretendidas.

35 A fin de obtener una composición de proteína y particularmente una composición de anticuerpo que tiene propiedades mejoradas, la célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína/anticuerpo que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

- (i) No comprende NeuGc detectable.
Como se bosquejó anteriormente, una glicosilación NeuGc puede tener propiedades inmunogénicas en los seres humanos. Por tanto, es deseable evitar una glicosilación respectiva tanto como sea posible. Una glicosilación respectiva se evita usando células sanguíneas humanas inmortalizadas, y en particular usando una célula huésped de origen leucémico mieloide.
- 40 (ii) Tiene un grado de galactosilación, esto es, en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína aumentado en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC N° CRL-9096] cuando se expresa en la misma.
Los residuos de galactosa se encuentran principalmente beta enlazados en 1-4 a los residuos GlcNAc en las antenas del complejo de tipo N-glicano de los anticuerpos, pero también se han encontrado enlaces beta-1,3. Sin embargo, usualmente aparecen en estructuras trianténarias. La influencia del grado de galactosilación sobre la actividad es, en particular con respecto a anticuerpos, notable. Se ha demostrado que el agotamiento de galactosa conduce a una actividad CDC reducida. Por tanto, puede preferirse tener un alto grado de galactosilación. La galactosilación también puede jugar un papel importante para otras proteínas. Cuando se hace referencia a la estructura de carbohidrato totales de una molécula de proteína, se consideran todas las glicosilaciones de la molécula de proteína. En caso de que se analicen las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína, el foco recae en una(s) estructura(s) de carbohidratos específica(s), tal como p.ej. la(s) estructura(s) de carbohidratos unida(s) a la Asn 297 de la parte Fc de una molécula de anticuerpo (por favor, véase también la Fig. 18). En caso de que se evalúe una estructura específica respectiva, se determina el contenido/composición de esta estructura específica.
- 50 También se podría hacer referencia a unidades carbohidrato totales y cadenas de carbohidrato particulares para definir dichas características (estos son sinónimos).
- 55 (iii) Tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC N° CRL-9096] cuando se expresa en la misma. En particular, en caso
- 60
- 65

de que se produzca un anticuerpo según los métodos de la presente invención, una cantidad alta de estructuras G2 es beneficiosa. Una "estructura G2" define un patrón de glicosilación en donde se encuentra galactosa en ambos extremos de la estructura biantenaria unida a la región Fc en caso de un anticuerpo (por favor, véase también la Fig. 18). Si se encuentra una molécula de galactosa, se llama estructura G1, si no hay galactosa, estructura G0. Se encontró a menudo que un patrón de glicosilación G2 mejora la CDC de anticuerpos. Por tanto, se prefiere que esté presente una cantidad al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% o incluso más que 100% más alta de estructuras G2 en la composición de proteína/anticuerpo producida. Se describen en la presente memoria líneas celulares adecuadas que consiguen un patrón de glicosilación G2 alto respectivo.

Como un grado de glicosilación global alto es a menudo beneficioso para la CDC de los anticuerpos, se prefiere a menudo obtener 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% o incluso más que 95% de estructuras G2 y/o G1 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la proteína, en particular una molécula de anticuerpo.

Según una realización adicional, están presentes más que 35% (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% o más que 70%) de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína.

(iv) Tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Como se bosquejó anteriormente, un alto grado de galactosilación es usualmente ventajoso. Por tanto, las líneas celulares se seleccionan preferiblemente de tal modo que se eviten estructuras G0. La cantidad de estructuras G0 es preferiblemente menor que 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o la cantidad es incluso más baja.

Según una realización adicional, están presentes menos que 22% (20%, 18%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, menos que 5%) de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína.

(v) No comprende Galalfa1-3Gal terminal detectable.

Como se bosquejó anteriormente, una glicosilación Galalfa1-3Gal puede ser inmunogénica en seres humanos. Esta glicosilación caracteriza un patrón, en donde un segundo residuo de galactosa está enlazado en posición alfa 1,3 al primer residuo de galactosa, dando como resultado el disacárido altamente inmunogénico Galalfa 1-3 Gal. Usando células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular una célula huésped de origen leucémico mieloide humana, se evita una glicosilación desventajosa respectiva.

(vi) Comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Se encuentran residuos de fucosa en diferentes sitios dentro del árbol de N-glicano, así, particularmente:

- enlazada en alfa 1,6 al residuo GlcNAc proximal a la cadena de aminoácido::
- enlazada en alfa 1,3 y alfa 1,4 al residuo GlcNAc antenarario;
- enlazada en alfa 1,2 al residuo Gal antenarario localizado.

En N-glicanos unidos a anticuerpos la inmensa mayoría de residuos de fucosa se encuentran enlazados en 1,6 al residuo GlcNAc proximal (llamado "fucosa núcleo"). Se ha encontrado que la ausencia de fucosa núcleo en el extremo reductor del N-glicano unido a anticuerpos potencia la actividad ADCC de anticuerpos en el factor 25 a 100. Debido a este efecto beneficioso sobre ADCC, se prefiere que la cantidad de fucosa sea al menos 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500% o más que 2000% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. La presente invención también proporciona líneas celulares especialmente diseñadas que consiguen una fucosilación global baja respectiva.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una glicoproteína, que comprende al menos 10% (15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o más que 80%) de carbohidratos de las estructuras de carbohidrato totales o de al menos una estructura de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína, que carecen de fucosa. Con respecto a anticuerpos se prefiere particularmente que las cadenas de carbohidrato enlazadas por N-glicósido unidas a la región Fc comprenda un extremo reductor que comprenda GlcNAc, en donde las cadenas de carbohidrato no contienen fucosa unida a la posición 6 del GlcNAc en el extremo reductor de la cadena de carbohidrato.

(vii) Comprende al menos una estructura de carbohidrato que contiene GlcNAc bisectora.

La N-acetilglucosamina bisectora (bisGlcNAc) se encuentra a menudo unida en beta 1,4 al residuo de manosa central de la estructura núcleo de tri-manosilo de los N-glicanos encontrados en los anticuerpos. La presencia de GlcNAc bisectora en el residuo de manosa central del anticuerpo Fc-N-glicano aumenta la actividad ADCC de los anticuerpos.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona de tal modo que dicha proteína producida comprende más estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales (o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína) de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que no contiene fucosa ni GlcNAc bisectora que las estructuras de carbohidrato respectivas que contienen GlcNAc bisectora y no contienen fucosa. Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona de tal modo que dicha proteína producida comprende más estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales (o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína) de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene más GlcNAc bisectora y fucosa que las estructuras de carbohidrato respectivas que contienen GlcNAc bisectora y no contienen fucosa.

(viii) Tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

La influencia del grado/patrón de sialilación en la actividad, semivida y biodisponibilidad difiere entre diferentes proteínas/anticuerpos. Por tanto, es beneficioso determinar para cada molécula de proteína/anticuerpo el patrón de sialilación optimizado de antemano, usando el método de cribado descrito en la presente memoria, antes de establecer la producción con la célula huésped más adecuada, que proporciona el patrón de glicosilación deseado. P.ej. existen varias publicaciones que informan de un impacto negativo de residuos de ácido siálico presentes en el glicano Fc de anticuerpos en efectos corriente abajo, es decir, CDC y ADCC. Sin embargo, se encontró que una alta sialilación prolonga la semivida de las moléculas sializadas. Por tanto, dependiendo de la proteína/anticuerpo producido, un patrón de sialilación diferente podría ser ventajoso, y las líneas celulares sanguíneas humanas inmortalizadas que tienen diferentes actividades de sialilación permiten obtener proteínas/anticuerpos que presentan un patrón de glicosilación optimizado.

Según una realización, la célula huésped se selecciona de tal modo que produce una proteína, que tiene un grado de sialilación disminuido con al menos una cantidad 10% más baja (preferiblemente 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, >95%) de ácidos siálicos en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Según una realización, el producto no comprende incluso NeuNAc detectable. Dependiendo de la proteína/anticuerpo producido, la presencia de ácidos siálicos y particularmente NeuNAc puede no contribuir a la actividad de la proteína/anticuerpo. En estos casos, puede ser favorable evitar la glicosilación de ácidos siálicos a fin de hacer al producto más homogéneo. Este, como el patrón de glicosilación de NeuNAc también puede variar en la composición de proteína resultante. Esto puede causar dificultades en la aprobación regulatoria del producto, porque el producto es debido al contenido de NeuNAc variante menos homogéneo.

Para proteínas/anticuerpos que no se basan en la presencia de una glicosilación de NeuNAc para su actividad, una evitación de una glicosilación de NeuNAc puede ser beneficiosa a fin de aumentar la homogeneidad. Sin embargo, "NeuNAc no detectable" no significa necesariamente que no hay absolutamente NeuNAc presente. De manera inversa, también están abarcadas realizaciones que tienen un grado bastante bajo de NeuNAc (p.ej. 1 a 10%).

Según una realización, el producto tiene un grado de sialilación disminuido con una cantidad al menos 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, >500%) más baja de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que la misma cantidad de moléculas de proteína de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Esta realización es beneficiosa en caso de que se supone que se expresa una proteína/anticuerpo, en donde la sialilación tiene un efecto negativo sobre la actividad de la proteína/anticuerpo.

Una glicosilación respectiva (ausencia o grado muy bajo de ácido siálico o particularmente NeuNAc) puede conseguirse usando células deficientes en sialilación tales como NM-F9 y NM-D4 en un medio exento de suero.

Según una realización adicional, el producto tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos un 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%,

450% o más que 500%) mayor en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

5 Como se bosquejó anteriormente, un grado de sialilación respectivamente aumentado puede proporcionar un efecto positivo sobre la semivida en suero de la proteína prolongándola. En estos casos se prefiere usar una línea celular que proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] y que también proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] y que también proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células deficientes en sialilación (tales como p.ej. NM-F9 y NM-D4), en donde se necesita añadir un precursor a fin de permitir que ocurra la sialilación. Sin embargo, si bien se añade un precursor respectivo cuando se cultivan estas células deficientes en sialilación, estas células usualmente sólo alcanzan 50 a 60% del grado de sialilación que se obtiene con células sanguíneas humanas inmortalizadas que no tienen mutación/defecto genético en la maquinaria de glicosilación necesaria para la sialilación. Por tanto, para realizaciones en donde se tiene como objetivo un grado de sialilación más alto, se prefiere usar líneas celulares capaces de proporcionar un grado de sialilación alto respectivo, y no usar NM-F9 ni NM-D4.

Según una realización adicional, el producto comprende NeuNAc enlazado en alfa2-6. Adicionalmente, puede estar presente en algún grado NeuNAc enlazado en alfa2-3. Con respecto a algunas proteínas/anticuerpos la presencia de una glicosilación NeuNAc es beneficiosa, en particular con respecto a la semivida de la proteína/anticuerpo. Proporcionar un NeuNAc enlazado en alfa 2-6 es beneficioso, porque este patrón de glicosilación se asemeja a un patrón de glicosilación humano. Las células de roedor proporcionan usualmente un NeuNAc enlazado en alfa2-3. Tampoco otras líneas celulares humanas existentes son capaces de proporcionar una glicosilación de NeuNAc enlazado en alfa 2-6 suficiente.

25 Son líneas celulares adecuadas para proporcionar un patrón de glicosilación respectivo p.ej. NM-H9D8 y NM-H9D8-E6.

Según una realización adicional, se usa una célula huésped, que produce una proteína que comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente más cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

El perfil de carga de una cadena de carbohidrato también puede influir en las propiedades, y debe por tanto ser considerado. Son grupos químicos que cargan las cadenas de carbohidrato p.ej. grupos azufre o ácido siálico.

Según una realización alternativa, dicho producto comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente menos cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una glicoproteína, que comprende al menos 2% (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, o más que 45%) de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora.

Según una realización, se usa una célula huésped para la producción de la proteína, que presenta las siguientes propiedades

- 55 - tiene una actividad aumentada, rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- tiene un rendimiento medio o máximo aumentado que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- 60 - tiene una homogeneidad mejorada, que es una homogeneidad de glicosilación mejorada en donde dicha composición molecular de anticuerpo tiene un grado de sialilación más bajo que el grado de sialilación de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- 65 - en caso de que dicha molécula de proteína sea una molécula de anticuerpo, tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos

una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o

- en caso de que dicha molécula de proteína sea una molécula de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Como se bosquejó anteriormente, las propiedades respectivas pueden ser obtenidas optimizando la glicosilación de la proteína como se describe en la presente memoria. Fue sorprendente ver que también el perfil de unión puede ser alterado y mejorado con algunos anticuerpos en base al perfil de glicosilación. También se describen en la presente memoria células huésped adecuadas.

Según una realización adicional, la homogeneidad mejorada de dicha composición molecular de proteína es una homogeneidad de glicosilación mejorada de dicha composición molecular de proteína que comprende al menos una de las siguientes características:

- NeuGc no detectable;
- NeuNAc no detectable;
- más NeuNAc que una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];
- NeuNAc enlazado en alfa 2-6 detectable.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína que comprende moléculas de proteína que tienen uno de los siguientes patrones de glicosilación característicos:

- (a)
- no comprende NeuGc detectable
 - no comprende Galalfa1-3Gal detectable
 - comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2
 - tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2
 - comprende bisecGlcNAc
 - comprende una cantidad aumentada de ácido siálico en comparación con una composición de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] o en comparación con una línea celular deficiente en sialilación tal como NM-F9 y NM-D4.

- (b)
- no comprende NeuGc detectable
 - no comprende Galalfa1-3Gal detectable
 - comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2
 - tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2
 - comprende bisecGlcNAc
 - comprende una cantidad disminuida de ácido siálico en comparación con una composición de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

- (c)
- no comprende NeuGc detectable
 - no comprende Galalfa1-3Gal detectable
 - comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2
 - tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2
 - comprende bisecGlcNAc
 - comprende 2-6 NeuNAc.

Se describen en la Tabla 9 combinaciones características adecuadas adicionales que conducen a características mejoradas.

Según la presente invención el término "molécula de proteína" significa proteína de interés o fragmentos activos y/o mutantes de la misma, por lo que se puede usar cualquier proteína, preferiblemente cualquier glicoproteína de origen humano. El término molécula de proteína significa cualquier molécula polipeptídica o una parte de la misma. Puede ser codificada por uno o varios ácidos nucleicos. Puede ser producida de un modo secretorio o una fracción de la misma o una proteína de fusión con un compañero de fusión. Preferiblemente, la proteína es secretada en el sobrenadante. Esta realización es en particular beneficiosa con respecto al procedimiento de producción global, como p.ej. se pueden evitar etapas de liberación (p.ej. con ésteres de forbol).

Los ejemplos de glicoproteínas de mamíferos incluyen moléculas tales como citocinas y sus receptores, por ejemplo los factores de necrosis tumoral TNF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del

5 tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotropinas, p.ej. hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), tirotrófina, y gonadotropina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; 10 activadores del plasminógeno, tales como urocinasa, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; 15 factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrófina-3, -4, -5, -6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína 20 morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs), p.ej. M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), p.ej. IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadhesinas; Glicoforina A; MUC1.

20 Muchas de las glicoproteínas mencionadas anteriormente pertenecen a las citocinas, haciendo referencia en la presente memoria a la clase general de hormonas que aparecen en células del sistema inmunitario, tanto linfocinas como monocinas, y otras. La definición pretende incluir, pero no se limita a, las hormonas que actúan localmente y no circulan en la sangre, y que, cuando se usan de acuerdo con la presente invención, darán como resultado una 25 alteración de la respuesta inmune de un individuo. Los ejemplos de citocinas inmunomodulatorias adecuadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, interferones (p.ej. IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma), interleucinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-12), factores de necrosis tumoral (p.ej. TNF-alfa y TNF-beta), eritropoyetina (EPO), ligando FLT-3, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), CD2 e ICAM. Tomando la eritropoyetina, se cree que la molécula causa que maduren las células progenitoras a eritrocitos, 30 mientras que se piensa que la trombopoyetina conduce a las células progenitoras a lo largo de la ruta trombocítica. CSF se refiere a una familia de linfocinas que inducen a las células progenitoras encontradas en la médula ósea a diferenciarse en tipos específicos de células sanguíneas maduras. El tipo particular de célula sanguínea madura que resulta de una célula progenitora depende del tipo de CSF presente. De manera similar, la formación de colonias de granulocitos-macrófagos es dependiente de la presencia de GM-CSF. Adicionalmente, citocinas de otros mamíferos con homología sustancial a las formas humanas de IL-2, GM-CSF, TNF-alfa y otros, serán útiles en la invención 35 cuando demuestren exhibir similar actividad sobre el sistema inmunitario. Se pueden emplear moléculas de adhesión o accesorias o combinaciones de las mismas, solas o en combinación con las citocinas.

40 De manera similar, las proteínas que sean sustancialmente análogas a cualquier proteína particular, pero tengan cambios relativamente menores de la secuencia de proteína, también encontrarán uso en la presente invención. Es bien sabido que pueden ser posibles a menudo algunas alteraciones pequeñas en la secuencia de aminoácidos en la secuencia de proteína, sin alterar las capacidades funcionales de la molécula de proteína, y por tanto se pueden hacer proteínas que funcionen como proteína parental en la presente invención pero difieran ligeramente de 45 secuencias conocidas actuales. Por tanto también están comprendidas variantes respectivas que mantienen la función biológica.

Glicoproteínas preferidas se seleccionan del grupo que comprende Glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferones, interleucinas, anticuerpos y/ fragmentos de los mismos.

50 Todas las moléculas de proteína mencionadas anteriormente pueden ser fusionadas a otras secuencias de péptidos o polipéptidos tales como, pero no limitadas a, enlazadores, moléculas activadoras o toxinas.

En una realización preferida de la invención el ácido nucleico codifica una forma secretora de la proteína o un fragmento de la misma. En una realización preferida la forma secretora carece de dominios transmembrana.

55 De acuerdo con la presente invención, el término "composición molecular de proteína" significa las moléculas de cualquier molécula de proteína expresada según los métodos de la presente invención y en particular en una célula huésped de la invención que puede ser aislada. Dicha composición molecular de proteína comprende al menos una molécula de proteína. Dicha composición de proteína comprende al menos una glicofoma de una molécula de proteína. Dicha glicofoma de una molécula de proteína significa una molécula de proteína que lleva una glicosilación particular o cadena de carbohidrato que es diferente en al menos un bloque constructor de azúcar, por ejemplo, pero no limitado a, una galactosa adicional, ácido siálico, bisecGlcNAc, fucosa, u otra modificación de 60 azúcar tal como, pero no limitada a, acetilación o sulfatación de otra glicofoma de la misma molécula de proteína. En otra realización de la invención la composición molecular de proteína puede comprender moléculas de más que una molécula de proteína expresada en una célula huésped. En una realización preferida la composición molecular de proteína de la invención comprende más moléculas en porcentaje de tal glicofoma o tales glicofomas de la 65

molécula de proteína que median una actividad más alta que una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína obtenida de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida adicional la composición molecular de proteína comprende más moléculas de tal glicofoma o glicofomas de la molécula de proteína en porcentaje que median una actividad más alta que la composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína obtenida de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

De acuerdo con la presente invención el término "molécula de anticuerpo" significa cualquier anticuerpo entero o fragmento de anticuerpo o una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo. Dicho anticuerpo entero puede ser cualquier anticuerpo o molécula de inmunoglobulina de cualquier clase o subclase o cualquier molécula que comprenda al menos un dominio de inmunoglobulina conocido por los expertos en la técnica, que comprenden, pero no se limitan a, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD de origen animal, tal como, pero no limitado a, origen humano, simio, roedor, ratón, rata, hámster, conejo, camello, ave, pollo o tiburón, y también puede ser una molécula que comprende secuencias de proteína de anticuerpos que se originan de diversos animales tales como anticuerpos quiméricos o humanizados donde diversos porcentajes de por ejemplo secuencias murinas y humanas son combinados a anticuerpos enteros y/o son mutados por ejemplo para disminuir la inmunogenicidad o aumentar la afinidad como saben los expertos en la técnica. En otra realización de la invención dicho anticuerpo entero también puede ser el anticuerpo entero descrito anteriormente con al menos una secuencia de aminoácidos o polipéptidos adicional.

En una realización preferida dicho anticuerpo entero es un IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM humano, humanizado o quimérico que comprende una región Fc humana. En una realización incluso más preferida de la invención dicho anticuerpo entero es un IgG1, IgG4 o IgM humano, humanizado o quimérico con una región Fc humana. Dicha región Fc humana comprende al menos una secuencia de 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos de un dominio constante de la región Fc de un anticuerpo humano, preferiblemente comprende al menos un dominio Fc de un anticuerpo humano, más preferiblemente comprende el dominio Cgamma2 humano, y más preferiblemente comprende todos los dominios constantes de la región Fc de un anticuerpo humano de una cierta clase o subclase. Dicha región Fc humana también puede comprender secuencias humanas de las que al menos un aminoácido fue mutado.

En la realización más preferida de la invención la molécula del anticuerpo entero es (i) un anticuerpo totalmente humano generado por ejemplo a partir de una célula o células sanguíneas productoras de anticuerpos humanos o a partir de un ratón transgénico en el que el locus del gen del anticuerpo del ratón es al menos parcialmente intercambiado por secuencias de anticuerpo humano, o bien (ii) un anticuerpo entero humanizado en el que al menos partes de las regiones variables de un anticuerpo murino o de rata, tales como las regiones de armazón o al menos un aminoácido de un armazón, fueron intercambiadas a secuencias humanas o mutadas para ser menos inmunogénicas en seres humanos que comprenden dominios constantes humanos, o bien (iii) un anticuerpo entero quimérico en el que la región variable es de murino o rata y comprende dominios constantes humanos.

Dichos anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos enteros humanizados y anticuerpos enteros quiméricos o partes de los mismos, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar y seleccionar estas moléculas de anticuerpo con o sin secuencias adicionales adecuadas, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

Dicho fragmento de anticuerpo es cualquier fragmento de un anticuerpo que comprende al menos 20 aminoácidos de dicho anticuerpo entero, preferiblemente al menos 100 aminoácidos. En una realización preferida el fragmento de anticuerpo comprende la región de unión del anticuerpo tal como un Fab, F(ab)2, multicuerpos que comprenden múltiples dominios de unión tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, anticuerpo de dominio único o aficuerpos. En otra realización preferida el fragmento de anticuerpo comprende la región Fc con todo o partes de sus dominios constantes, preferiblemente que comprende el segundo dominio (dominio Cgamma2). En otra realización el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo entero truncado donde al menos un aminoácido, tramos de polipéptido o dominios enteros son suprimidos. Esas moléculas pueden ser combinadas con secuencias adicionales para estabilización o para mejorar la unión de las moléculas tales como enlazadores.

Dicha molécula que comprende un fragmento de anticuerpo es cualquier molécula que comprende cualquiera de dichos fragmentos de anticuerpo u otros dominios de inmunoglobulina de al menos 20 aminoácidos. En una realización preferida dicha molécula que comprende un fragmento de anticuerpo son moléculas de fusión donde un fragmento de anticuerpo está fusionado a otras secuencias de proteína tales como secuencias efectoras, por ejemplo citocinas, factores co-estimuladores, toxinas o fragmentos de anticuerpo de otros anticuerpos a fin de generar moléculas con múltiples especificidades de unión tales como anticuerpos bi- o tri-específicos, o secuencias de multimerización tales como dominios MBP (proteína de unión a la manosa) para dar como resultado la multimerización de dominios de unión, o secuencias para la detección, purificación, secreción o estabilización tales como etiquetas, señales de localización o enlazadores, o similares. En otra realización preferida dicha molécula que

comprende un fragmento de anticuerpo son moléculas de fusión que comprenden la región Fc de un anticuerpo entero o partes del mismo, preferiblemente que comprenden el segundo dominio constante (dominio Cgamma2). Dichas moléculas de fusión son fusionadas por medios genéticos, donde las moléculas son codificadas por un ácido nucleico o son fusionadas por co-expresión de al menos dos ácidos nucleicos, por lo cual la fusión es causada por interacciones de proteína no covalentes o covalentes o son fusionadas por una combinación de ambos. La fusión genética entre un fragmento de anticuerpo y otra secuencia de polipéptido o molécula de proteína puede conseguirse por ingeniería genética donde ambas partes son codificadas por un único ácido nucleico con o sin aminoácidos adicionales entre medias. En una realización preferida adicional dichas moléculas de fusión comprenden al menos una región de unión de un fragmento de anticuerpo tal como un anticuerpo de dominio único, o Fab o una secuencia de unión no derivada de anticuerpos, tal como un dominio de lectina, y una región Fc o partes de la misma que comprenden el segundo dominio (dominio Cgamma). En otra realización preferida, las moléculas de fusión comprenden IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF, una toxina de péptido, o partes de la misma. Son fusionadas p.ej. por medios genéticos, donde las moléculas son codificadas por un ácido nucleico o son condensadas por co-expresión de al menos dos ácidos nucleicos, por lo cual la fusión es causada por interacciones de proteína no covalentes o covalentes o son fusionadas por un comion de un fragmento de anticuerpo tal como un anticuerpo de dominio único, Fab o Fab que está enlazado a secuencia de multimerización de MBP.

Todas aquellas moléculas de anticuerpo o partes de las mismas así como los métodos para construir, identificar, probar y seleccionar estas moléculas de anticuerpo con o sin secuencias adicionales adecuadas, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención el término "composición molecular de anticuerpo" significa las moléculas de cualquier molécula de anticuerpo expresadas en una célula huésped de la invención que puede ser aislada. Dicha composición molecular de anticuerpo comprende al menos una molécula de anticuerpo. Dicha composición de anticuerpo comprende al menos una glicofoma de una molécula de anticuerpo. Dicha glicofoma de una molécula de anticuerpo significa una molécula de anticuerpo que lleva una glicosilación particular o cadena de carbohidrato que es diferente en al menos un bloque constructor de azúcar, por ejemplo, pero no limitado a, una galactosa adicional, ácido siálico, bisecGlcNAc, fucosa, u otra modificación de azúcar tal como, pero no limitada a, acetilación o sulfatación de otra glicofoma de la misma molécula de anticuerpo. En otra realización de la invención la composición molecular de anticuerpo puede comprender moléculas de más que una molécula de anticuerpo expresada en una célula huésped. En una realización preferida la composición molecular de anticuerpo de la invención comprende más moléculas en porcentaje de tal glicofoma o tales glicofomas de la molécula de anticuerpo que median una actividad más alta que una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo obtenida de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida adicional la composición molecular de anticuerpo de la invención comprende más moléculas de tal glicofoma o glicofomas de la molécula de anticuerpo en porcentaje que median en una citotoxicidad celular mediada por Fc más alta y/o una unión mejorada que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo obtenida de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

De acuerdo con la presente invención el término "célula huésped de origen leucémico mieloide" o formulaciones equivalentes significa cualquier célula o línea celular de origen leucémico mieloide, o cualquier célula o línea celular mieloide humana o precursora mieloide que pueda ser obtenida de un paciente con leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide humana o precursora mieloide que pueda ser obtenida de un donante humano, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una de esas células mencionadas anteriormente.

En otra realización de la invención dicha célula huésped de origen leucémico mieloide humano o dicha célula sanguínea humana inmortalizada de la invención también comprende tales células o líneas celulares que fueron obtenidas fusionando al menos una de las células huésped mencionadas anteriormente, en particular las de origen leucémico mieloide, con otra célula de origen humano o animal, tales como, pero no limitadas a, linfocitos B, células CHO. Los expertos en la técnica pueden identificar y usar fuentes y métodos adecuados para obtener, generar y/o inmortalizar células adecuadas de seres humanos para células huésped adecuadas de origen leucémico mieloide humano.

El término célula o línea celular derivada de dicha célula huésped significa cualquier célula o línea celular que puede ser obtenida por cualquier medio de cultivo y clonación con o sin mutación previa o ingeniería genética de dicha célula huésped de origen leucémico mieloide, y comprende la selección de aquellas células o líneas celulares derivadas de dicha célula huésped con las propiedades deseadas. Dicho cultivo y clonación se basa en el hecho de que se pueden obtener clones de células con diferentes propiedades a partir de cultivos celulares primarios, cultivos de células e incluso cultivos de clones de células por rondas múltiples de pasaje y clonación de las células usando preferiblemente métodos de clonación de célula única tales como dilución limitada o clasificación de células basada en citometría de flujo. En una realización preferida dicha célula o línea celular derivada de dichas células huésped se selecciona por unión a una lectina o anticuerpo de unión a carbohidratos. Dicha mutación puede ser realizada por

tratamiento conocido por los expertos en la técnica con mutágenos físicos, químicos o biológicos, tales como, pero no limitados a, radiación, agentes alquilantes o EMS (metanosulfonato de etilo), proteínas tales como lectinas, o partículas de virus. Dicha ingeniería genética puede ser realizada por métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como eliminación de genes por medio de recombinación homóloga específica a sitio, uso de transposones, mutagénesis específica a sitio, transfección de ciertos ácidos nucleicos, o silenciamiento de genes, o productos génicos. Los métodos para dicho cultivo y clonación, dicha mutación y mutágenos y dicha ingeniería genética son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen algunos ejemplos en detalle en la solicitud de patente internacional WO2005/017130 A2, la patente de EE.UU. 2003/0115614 A1, o se describen en la presente memoria. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o adoptar y/o modificar un método adecuado o combinación de métodos para la generación de una célula o línea celular adecuada derivada de dicha célula huésped de la invención.

Dichas célula o líneas celulares derivadas de dicha célula huésped se seleccionan debido a propiedades de esas células que son ventajosas cuando se comparan con su célula o línea celular parental, tales como, pero no limitadas a, tiempos de doblaje más cortos, crecimiento más rápido, posibilidad de crecer bajo densidades más altas, pueden producir más, crecen bajo condiciones exentas de suero y/o en medios exentos de proteínas, eficacias de clonación más altas, eficacias de transfección más altas para ADN, velocidades de expresión más altas de composiciones moleculares de anticuerpos, actividades más altas para una composición molecular de anticuerpo expresada en las mismas, homogeneidades más altas de una composición molecular de anticuerpo expresada en la presente memoria, y/o robustez más alta para aumentar a escala. Los métodos para seleccionar las células con propiedades ventajosas son conocidos por los expertos en la técnica o se describen en la presente memoria. Un método para generar una célula huésped de la invención puede comprender (a) incubar una célula de leucemia mieloide humana con una lectina o un anticuerpo que reconoce un epítipo desialilado o un epítipo que carece de un ácido siálico pero que se une no o sólo significativamente menos a la forma sialilada del epítipo, y (b) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (c) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado, y (d) seleccionar una célula, células o un clon de célula que se une fuertemente a una lectina o un anticuerpo que se une a un epítipo con ácido siálico.

Es más preferido el método descrito anteriormente, en donde dicha lectina o dicho anticuerpo que reconoce un epítipo desialilado o un epítipo que carece de un ácido siálico es Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, o PNA, y en donde dicha célula de leucemia mieloide humana es la línea celular K562, KG-1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, H9, NM-H10.

El método para generar una célula huésped de la invención con alta sialilación y propiedades biotecnológicas favorables tales como rápido crecimiento celular comprende (i) incubar una célula de leucemia mieloide humana de la invención como célula originadora, preferiblemente K562, con una lectina o preferiblemente un anticuerpo que reconoce un epítipo desialilado o un epítipo que carece de un ácido siálico pero que se une no o menos a la forma sialilada del epítipo, tal como, pero no limitado a, Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, o PNA (lectina de *Arachis hypogaea*, aglutinina de cacahuete), preferiblemente unido a perlas magnéticas, y (ii) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (iii) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado, y (iv) seleccionar una célula, células o un clon de células, preferiblemente después de clonación celular única, que se une fuertemente a una lectina o un anticuerpo que se une a un epítipo con ácido siálico, tal como SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*) o MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MAL I (lectina de *Maackia amurensis* I), preferiblemente SNA.

Un método para generar una célula huésped de la invención con alta sialilación y propiedades biotecnológicas favorables tales como rápido crecimiento celular puede comprender (i) incubar K562 con Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, o PNA unido a perlas magnéticas, y (ii) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (iii) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado de aproximadamente una a 6 semanas, y (iv) seleccionar un clon de células después de clonación celular única, que se une fuertemente a SNA. Esas células pueden unirse más fuertemente a SNA que la célula originadora, o pueden crecer más rápido que la célula originadora.

La célula originadora puede ser tratada con metanosulfonato de etilo antes de la etapa (i).

Los expertos en la técnica pueden seleccionar condiciones y métodos adecuados y optimizarlos para generar estas células huésped. Se pueden encontrar más detalles para algunas de las etapas en las solicitudes de patente internacional WO2005/017130 A2 y WO2005/080585 A1.

Se pueden usar células sanguíneas humanas inmortalizadas como células huésped, que se seleccionan de los siguientes grupos 1 a 4:

- (a) grupo 1, que comprende células huésped que tienen una alta actividad de sialilación tal como K562;
- (b) grupo 2, que comprende células huésped que tienen debido a una deficiencia genética o medios de inhibición de la expresión (p.ej. RNAi) una baja o ninguna sialilación; actividad comparable a y que incluye NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] y GTX-2;
- (c) grupo 3, que comprende células huésped que tienen un grado de sialilación más alto que K562 tales como NM-H9 y NM-H9D8;

(d) grupo 4, que comprende células huésped que tienen una baja o incluso ninguna actividad de fucosilación tales como NM-H9D8-E6 y NM H9D8-E6Q12.

5 Dicha línea celular generada puede ser NM-H9D8. Como clon celular más preferido generado por el método descrito anteriormente, se seleccionó NM-H9D8 y se depositó bajo DSM ACC 2806 en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von
10 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 15 de septiembre de 2006. Otros clones celulares tales como NM-E-2F9, NM-C-2F5 o NM-H9D8-E6 (DSM ACC 2807) se seleccionaron por incubación de las células parentales con una o más lectinas y siguiendo clonación celular única usando clasificación celular por citometría de flujo, por lo que se realizó un
15 procedimiento de selección positiva o una combinación de selección positiva y negativa. Para obtener clones celulares con características estables los clones celulares obtenidos se reclonaron al menos una vez por dilución limitada como se describe anteriormente.

15 Dicha célula sanguínea humana inmortalizada, que es preferiblemente una célula huésped de origen leucémico mieloide, puede crecer y producir la composición molecular de proteína/anticuerpo bajo condiciones exentas de suero. Dicha célula sanguínea humana inmortalizada, que es preferiblemente una célula huésped de origen leucémico mieloide, puede crecer bajo condiciones exentas de suero. Además, también el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y la composición molecular de proteína/anticuerpo también puede ser aislada bajo condiciones exentas de suero. Poder trabajar bajo condiciones
20 exentas de suero es particularmente importante cuando se preparan proteínas terapéuticas, ya que las contaminaciones de suero son inaceptables en el proceso regulatorio.

25 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, KG1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, o una mezcla de células o líneas celulares que comprende al menos una de esas células mencionadas anteriormente. La célula huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], o NM-H9D8-E6
30 DSM ACC 2807, o NM H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856), GT-2X (depositada bajo DSM ACC2858 en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 7 de septiembre de 2007) o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de estas líneas celulares.

35 Las células NM-F9 [DSM ACC2606] y NM-D4 [DSM ACC2605] fueron depositadas por Nemo Biotherapeutics GmbH & Co.KG, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania), que autorizó al solicitante a hacer referencia al material biológico depositado descrito en la presente memoria.

40 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

45 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, tal como K562 [ATCC CCL-243], o una célula o línea celular derivada de dicha célula huésped.

50 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, o GT-2X, o NM H9D8-E6Q12 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

55 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula, células o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, o GT-2X, o NM H9D8-E6Q12 que crecen y producen una composición molecular de anticuerpo de la invención bajo condiciones exentas de suero, y lo más preferido en la presente memoria una célula, células o línea celular que crecen bajo condiciones exentas de suero y el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo puede ser introducido en estas células y se aísla una composición molecular de anticuerpo bajo condiciones exentas de suero.

60 La célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula, células o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, GT-2X, o NM-H9D8-E6, o NM H9D8-E6Q12 que crecen y producen una composición molecular de anticuerpo de la invención bajo condiciones exentas de suero, y lo más preferido en la presente memoria una célula, células o línea celular que crecen bajo condiciones exentas de suero y el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo puede ser introducido en estas células y se aísla una composición molecular de anticuerpo bajo condiciones exentas de suero.

65 Opcionalmente, la célula sanguínea humana inmortalizada y la célula huésped de origen leucémico mieloide humano no es una de las líneas celulares deficientes en sialilación NM-F9 y NM-D4 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped que tienen las mismas propiedades. Esto es beneficioso en caso de que se tenga como objetivo un alto grado de sialilación. La célula huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en K562, NM H9D8, NM H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12 y células huésped derivadas de

cualquiera de estas células huésped.

Las líneas celulares descritas en conjunción con la presente invención tiene un tiempo de doblado de 14 a 24 horas, que es muy rápido en comparación con otros sistemas de expresión mamíferos, dependiendo de la línea celular de la invención.

Además, no se conoce un sistema vectorial de alta expresión adecuado general para expresión de anticuerpos de alto rendimiento en líneas celulares humanas, dado que las células humanas normalmente no carecen del gen DHFR y por tanto no permiten el uso del sistema de amplificación dhfr/metotrexato. Por tanto, según una realización adicional de la presente invención se proporciona una realización que permite aumentar el rendimiento de producto.

Según esta realización, adicionalmente se introduce un ácido nucleico en la célula huésped, que codifica una variante DHFR resistente al antifolato. La dihidrofolato reductasa, o DHFR, reduce el ácido dihidrofolico a ácido tetrahidrofolico, usando DADPH como donador de electrones, que puede ser convertido en los tipos de cofactores de tetrahidrofolato usados en la química de la transferencia del carbono 1. Los antifolatos inhiben la enzima DHFR, conduciendo a muerte celular. Para proporcionar un ácido nucleico que codifica una variante DHFR resistente al antifolato, se proporciona una herramienta para seleccionar células que fueron transfectadas con el ácido nucleico y además, permite una amplificación de los ácidos nucleicos a ser expresados en las células huésped.

El ácido nucleico que codifica dicha variante DHFR resistente al antifolato puede ser p.ej. introducido por medio de un vector independiente al ácido nucleico que codifica la proteína/anticuerpo a ser expresado en la célula huésped. Se prefiere transfectar el vector que codifica la variante DHFR resistente al antifolato básicamente al mismo tiempo que el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína/anticuerpo. Esta realización estimula que el ácido nucleico que codifica dicha proteína/anticuerpo a ser expresada se integre en el genoma de la célula huésped en el mismo sitio genético que el ácido nucleico que codifica la variante DHFR resistente al antifolato, lo que es beneficioso en caso de que se desee una amplificación del ácido nucleico que codifica dicha proteína/anticuerpo.

Alternativamente, se puede usar un sistema vectorial que comprende el ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicha proteína a ser expresada así como el ácido nucleico que codifica la variante DHFR resistente al antifolato.

Las células huésped son cultivadas después con dicho antifolato. Esto tiene el efecto de que esas células huésped, que fueron transfectadas con éxito con el ácido nucleico que codifica dicha variante DHFR resistente al antifolato, pueden crecer a pesar de la presencia del antifolato. De este modo se pueden seleccionar células transfectadas con éxito.

Según una realización adicional, la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de dicha proteína/anticuerpo es amplificada por etapas aumentando la concentración de antifolato en el cultivo. El aumento de la concentración de antifolato en el medio de cultivo conduce a un aumento de las copias de la variante DHFR resistente al antifolato en el genoma. Se supone que esto se consigue por eventos de recombinación en las células. De este modo, también el número de copias del ácido nucleico que codifica al menos parte de la proteína a ser expresada es también aumentado si el ácido nucleico que codifica dicha proteína está situado cerca de la variante DHFR resistente al antifolato en el genoma, lo que puede ser promovido transfectando vectores independientes simultáneos o usando un vector que comprende ambas secuencias de ácido nucleico. Mediante este mecanismo se obtienen células huésped que expresan la proteína/anticuerpo en un rendimiento más alto.

Preferiblemente, el antifolato es metotrexato.

La secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o una parte de la misma, es amplificada preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de antifolato, preferiblemente metotrexato, por lo que la concentración de dicho antifolato, preferiblemente metotrexato, es aumentada en al menos 100% en cada ronda sucesiva.

Un ácido nucleico adecuado para proporcionar dicha variante DHFR resistente al antifolato codifica un polipéptido del grupo de secuencia ID No. 1 a 9, preferiblemente secuencia ID No. 1.

Se describen con más detalle también más detalles y realizaciones de este sistema de amplificación a continuación.

Un método para producir una proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, puede comprender:

- (a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína y preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1; y
- (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, preferiblemente una molécula de

anticuerpo o al menos una parte de la misma, cultivando dicha célula huésped con metotrexato, preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato, por lo que la concentración de metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva; y

- 5 (c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, y
(d) aislar dicha proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo.

10 Un método para producir una composición de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada puede comprender:

- 15 (a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma; y
(b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo; y
(c) aislar dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada.

20 Un método para producir una composición de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada puede comprender:

- 25 (a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma; y
(b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo; y
(c) aislar dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada.

30 Además, un método para producir una composición de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada puede comprender:

- 35 (a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1; y
(b) amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha molécula de anticuerpo o una parte de la misma cultivando dicha célula huésped con metotrexato, preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato, por lo que la concentración de metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva; y
(c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo, y
(d) aislar dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada.
- 40
45

50 Dicho ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de ella y dicho ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, puede ser un ácido nucleico o dos ácidos nucleicos independientes.

55 Para seleccionar una célula huésped adecuada para obtener una proteína que tiene un perfil de glicosilación optimizado, es ventajoso realizar el método de cribado/selección según la presente invención. Después de que se ha determinado una célula huésped adecuada por el método de selección según la presente invención, dicha célula huésped se usa entonces para producir una proteína como se describe en la presente memoria.

Por tanto, la invención proporciona un método para seleccionar una célula huésped para producir una proteína que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

- 60 (i) tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o
65 (ii) comprende más que 35% de estructuras G2 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas

de proteína en dicha composición de proteína; y/o

(iii) tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iv) comprende menos que 22% de estructuras G0 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína; y/o

(v) comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(vi) comprende al menos 2% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora; y/o

(vii) tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma, en donde

- tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; o

- tiene un grado de sialilación disminuido, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

mediante las siguientes etapas

(a) introducir en al menos dos células sanguíneas humanas inmortalizadas diferentes como células huésped al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma; en donde al menos una de dichas células huésped es una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en las líneas celulares DSM ACC2858 (GT-2X), DSM ACC2806 (NM-H9D8), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de las mismas; y

(b) cultivar dichas al menos dos células huésped diferentes, en donde cada célula huésped diferente produce una composición de proteína que tiene un patrón de glicosilación divergente del patrón de glicosilación producido por la otra célula huésped;

(c) aislar dichas composiciones de proteína expresadas que llevan un patrón de glicosilación diferente de las al menos dos células huésped diferentes; y

(d) seleccionar dicha célula huésped que produce una composición de proteína que tiene al menos una de las características de glicosilación definidas en (i) a (vii).

Los detalles con respecto al patrón de glicosilación y líneas celulares adecuadas para obtener dicho patrón se describen anteriormente y son también aplicables a y adecuadas para el método de cribado para seleccionar una célula huésped adecuada según la presente invención.

Realizar una etapa de cribado respectiva antes de establecer el método de producción descrito en la presente memoria es ventajoso, ya que esta realización permite la selección de la célula huésped más adecuada para producir la composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene un patrón de glicosilación optimizado. Según la idea básica de este sistema de cribado, la proteína de interés es expresada en al menos dos líneas celulares diferentes que tienen un patrón de glicosilación divergente. P.ej. una línea celular puede presentar un alto grado de sialilación y la otra puede presentar un bajo grado de sialilación (o fucosilación y/o galactosilación) o incluso características de glicosilación desconocidas. Los productos obtenidos a partir de las diferentes líneas celulares, por consiguiente, llevan un patrón de glicosilación característico para la línea celular respectiva.

Las características de las proteínas producidas en las diferentes líneas celulares p.ej. con respecto a su actividad (p.ej. ADCC y CDC en anticuerpos), afinidad, semivida en suero y otras características importantes pueden ser determinadas entonces. Los resultados permiten elegir la línea celular que tiene la mejor maquinaria de glicosilación a fin de obtener una proteína que está optimizada con respecto a su patrón de glicosilación. Como las características

decisivas (p.ej., afinidad, semivida en suero, etc.) varían, este método es particularmente ventajoso.

Preferiblemente, dicha proteína a ser producida presenta al menos una de las siguientes características:

- 5 (a) en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- 10 (b) en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- 15 (c) tiene un rendimiento medio o máximo aumentado de dicha composición molecular de proteína que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Al menos una de dichas células huésped es una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas.

20 Una célula huésped de origen leucémico mielóide humano se puede seleccionar de uno de los siguientes grupos 1 a 4:

- 25 (a) grupo 1, que comprende células huésped que tienen una alta actividad de sialilación tales como K562 o una célula o línea celular derivada de la misma,
- (b) grupo 2, que comprende células huésped que tienen debido a una deficiencia genética o medios de supresión de la expresión (p.ej. RNAi) una baja o ninguna sialilación, tales como NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] y GTX-2 o una célula o línea celular derivada de las mismas,
- 30 (c) grupo 3, que comprende células huésped que tienen un grado de sialilación más alto que K562, tales como NM-H9 y NM-H9D8 o una célula o línea celular derivada de las mismas,
- (d) grupo 4, que comprende células huésped que tienen una baja o ninguna actividad de fucosilación, tales como NM-H9D8-E6 o una célula o línea celular derivada de la misma.

35 Preferiblemente, al menos dos o tres células huésped usadas en el procedimiento de cribado se seleccionan de los grupos anteriores. Sin embargo, también es posible incluir otras células huésped derivadas de otro origen (p.ej. células Hek 293) en el sistema de cribado a fin de ampliar más los diferentes patrones de glicosilación analizados.

La célula huésped obtenida produce preferiblemente una proteína, en particular un anticuerpo que presenta al menos uno de los patrones de glicosilación mostrados en la Tabla 9.

40 Según la invención el término introducir un ácido nucleico significa cualquier método conocido por los expertos en la técnica para introducir un ácido nucleico, o dos o más ácidos nucleicos en una célula o células huésped mamíferas por métodos tales como, pero no limitados a, electroporación, transfección usando lípidos catiónicos, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, o infección por partículas de virus tales como adenovirus o retrovirus o una combinación de los mismos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar un método adecuado para la introducción de uno o más ácidos nucleicos.

De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo es cualquier ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma. La molécula de anticuerpo de la invención puede ser codificada de este modo por una única o por múltiples moléculas de ácido nucleico.

50 Dicha parte de una molécula de anticuerpo codificada por dicho ácido nucleico comprende al menos una secuencia de 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos de una molécula de anticuerpo o de un dominio constante y/o variable de la molécula de anticuerpo. La secuencia comprendida que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma puede ser separada por al menos otra secuencia, tal como p.ej. un intrón. La secuencia de un dominio puede comprender al menos una mutación de aminoácidos.

60 De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que codifica una molécula de proteína es cualquier ácido nucleico que codifica la molécula de proteína o al menos una parte de la misma. La molécula de proteína puede ser codificada de este modo por una única o por múltiples moléculas de ácido nucleico. La secuencia que codifica la molécula de proteína o al menos una parte de la misma puede ser separada por al menos otra secuencia, tal como p.ej. un intrón. La secuencia de la molécula de proteína puede comprender al menos una mutación de aminoácidos.

65 En una realización preferida el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de ella comprende al menos un dominio variable y/o un dominio constante de la molécula de anticuerpo, más preferiblemente ambos, más preferiblemente tal que comprende una secuencia humana al menos en la parte del dominio o dominios constantes, e incluso más preferido tal que comprende el dominio Cgamma2 humano, y lo más

preferiblemente comprende todos los dominios constantes de la región Fc de un anticuerpo humano de una cierta clase o subclase y el dominio variable.

5 Según una realización la proteína y en particular la molécula de anticuerpo es codificada por un único ácido nucleico. En otra realización preferida la proteína, en particular una molécula de anticuerpo, es codificada por dos ácidos nucleicos o por tres ácidos nucleicos.

10 En una realización preferida adicional un ácido nucleico codifica una parte de la molécula de anticuerpo que codifica para el dominio variable y/o constante de la cadena ligera, y otro ácido nucleico codifica para otra parte de la molécula de anticuerpo que codifica para el dominio variable y/o al menos un dominio constante de la cadena pesada.

15 De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 significa que dicho ácido nucleico codifica para al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1. Cualquier número de estas secuencias es adecuado, siempre y cuando pueda ser introducido con éxito en la célula huésped de la invención. En una realización preferida dicho ácido nucleico codifica para uno, dos o tres polipéptidos del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, más preferiblemente para un polipéptido, y lo más preferiblemente para el polipéptido de secuencia #1. En el sentido de la invención dicho ácido nucleico también puede codificar para un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, que tiene al menos una mutación de aminoácidos, siempre y cuando esta mutación permita la amplificación del ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma mediante metotrexato como se describe en otras partes de la presente memoria.

25 La secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, puede ser parte de la misma molécula de ácido nucleico que el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria o en moléculas de ácido nucleicos independientes.

30 En otra realización preferida de la invención un ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1, puede ser introducido en la célula huésped de la invención independientemente de dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican la molécula de anticuerpo o partes de la misma de la invención. Esto puede hacerse introduciendo dicho ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, junto con, antes o después de introducir dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican la molécula de anticuerpo o partes de la misma de la invención. En una realización preferida esto se realiza en paralelo, y en otra realización preferida la célula huésped de la invención ya comprende dicho ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

45 La amplificación de dicho ácido nucleico establemente introducido o varias copias de dicho ácido nucleico que codifica la proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o fracción del mismo, puede ser realizada como se describe en otras partes de la presente memoria y en los ejemplos usando metotrexato.

50 En una realización preferida el ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, comprende al menos otro elemento genético que permite la selección de aquellas células en las que el ácido nucleico fue introducido con éxito, tales como, pero no limitados a, genes con resistencia a antibióticos, tal como, pero no limitado a, el elemento genético que codifica para una resistencia a puromicina o neomicina. Además estos ácidos nucleicos comprenden uno o varios elementos genéticos tales como promotores, potenciadores, sitios de poliadenilación, y/o intrones, para expresión de la molécula de anticuerpo en las células huésped de la invención, y elementos genéticos tales como de origen bacteriano de replicación, promotores y elementos para selección de bacterias transfectadas tales como genes de resistencia a antibióticos para multiplicar el ácido nucleico en una bacteria.

55 Los promotores adecuados incluyen el promotor del gen IE (temprano inmediato) del citomegalovirus (CMV), promotor temprano SV40, el promotor de un retrovirus, promotor de metalotioneína, promotor del choque de calor, promotor SR alfa, promotor EF-1 alfa, etc. El potenciador del gen IE del CMV humano se puede usar en combinación con el promotor.

60 Esos y más elementos genéticos son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser seleccionados, combinados, optimizados e introducidos en dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente un molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma por los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas de dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma o una combinación de ácidos nucleicos se describen en la presente memoria y en los ejemplos, así como elementos genéticos preferidos para uso y combinación, sin embargo, la invención no está

restringida al uso de esos, y pueden ser combinados u optimizados adicionalmente por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o combinar el elemento genético adecuado, construir los consiguientes vectores de ácido nucleico o elementos para introducir uno o más ácidos nucleico en una línea celular según la invención.

Dicho ácido nucleico o combinación de ácidos nucleicos que codifican la proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, así como dichos elementos genéticos adicionales, así como los métodos para introducirlos, tal como transfectarlos en las células huésped de la invención para expresión de la composición molecular de anticuerpo o en bacterias para multiplicación son conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar, seleccionar y combinar estos ácido o ácidos nucleicos y combinarlos con secuencias adicionales adecuadas para la selección de aquellas células que están transfectadas con éxito, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

Se describen en detalle realizaciones preferidas de la invención en los ejemplos.

En una realización preferida de la invención el ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, comprende un elemento genético para la selección de aquellas células huésped de la invención en las que el ácido nucleico está introducido con éxito, tal como, pero no limitado a, neomicina o puromicina, más preferiblemente comprende además un promotor tal como EF-1 alfa o promotor CMV, más preferiblemente comprende además un potenciador CMV, más preferiblemente comprende además un elemento genético que permite la selección de bacterias que están transfectadas con el ácido nucleico y un elemento genético para replicación tal como el origen de replicación ColE1 para multiplicación de dicho ácido nucleico en bacterias, e incluso más preferiblemente comprende además un elemento genético para multiplicación de dicho ácido nucleico en células COS tales como el origen SV40. Estos elementos son conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser seleccionados, combinados, optimizados y usados por los expertos en la técnica.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende una secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente dicho ácido nucleico que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, o resistencia a neomicina, o una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante de la cadena pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo o el dominio variable y todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo entera.

En una realización incluso más preferida de la invención uno de dicho ácido nucleico descrito anteriormente codifica al menos una parte de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo y un segundo de dicho ácido nucleico descrito anteriormente codifica al menos otra parte de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo, ambos ácidos nucleicos son introducidos en la misma célula huésped de la invención. Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina y el otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican dos secuencias de aminoácidos de la molécula de proteína o al menos una parte de la misma.

Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, un otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina. Más preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina o neomicina, preferiblemente resistencia a puromicina, y el otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica

una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende tres secuencias de ácido nucleico que codifican tres secuencias de aminoácidos de la molécula de proteína o al menos una parte de la misma.

5 Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina, y un otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

10 En una realización incluso más preferida uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina o neomicina y el otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1. En una realización incluso más preferida uno de dichos ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera y comprende además a una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1, y el otro dicho ácido nucleico comprende secuencias que codifican el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes, de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo y comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una resistencia a puromicina o neomicina, preferiblemente resistencia a puromicina.

20 En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo y al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo.

25 En una realización preferida de la invención los dominios constantes codificados por ácidos nucleicos anteriores o descritos en otras partes son dominios constantes humanos de IgG o IgM, preferiblemente IgG1, IgG4 o IgM humanos, o un dominio o una combinación de dominios de los mismos, por lo cual preferiblemente se usan secuencias genómicas o secuencias derivadas de secuencias genómicas que comprenden al menos un intrón, que se pueden ser seleccionados, construidos y optimizados por los expertos en la técnica.

30 En una realización preferida adicional de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además el promotor EF-1alfa / potenciador CMV o un promotor derivado del promotor CMV, preferiblemente CMV-E.

35 En una realización preferida adicional de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además un péptido de señales de secreción, preferiblemente la señal de secreción del receptor de linfocitos T.

40 En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además un péptido de señales de secreción, preferiblemente la secuencia #10.

45 Dicho ácido nucleico o combinación de ácidos nucleicos que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, así como dichos elementos genéticos adicionales, así como los métodos para introducirlos son conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar, seleccionar y combinar estos ácidos o ácidos nucleicos y combinarlos con secuencias adicionales adecuadas para la selección de aquellas células que están transfectadas con éxito, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpos son conocidos por los expertos en la técnica.

Se describen en detalle realizaciones preferidas de la invención en los ejemplos.

55 La introducción del ácido nucleico puede ser transiente o bien estable.

60 De acuerdo con la presente invención el término amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma cultivando dicha célula huésped con un antifolato, en particular metotrexato significa que una célula huésped de la invención descrita en otras partes de la presente memoria en la que al menos un ácido nucleico que codifica la proteína a ser expresada tal como p.ej. una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de DHFR resistente al antifolato, preferiblemente al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, se introdujo y se cultiva mediante al menos una concentración de antifolato, preferiblemente metotrexato. Un tiempo de cultivo típico es entre una y dos semanas para cada ronda, a concentraciones típicas de aproximadamente 20 nM a 3.000 nM, preferiblemente entre aproximadamente 50 nM y 2.000 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 100 nM y

2.000 nM. La duración de un tratamiento de amplificación de antifolato/metotrexato, así como la concentración y los correspondientes vectores de ácidos nucleicos pueden ser optimizadas por los expertos en la técnica, y también se describe en una realización preferida en los ejemplos. Las condiciones de amplificación óptimas pueden diferir entre diferentes moléculas de proteína/anticuerpo codificadas y la utilización de diferentes ácidos nucleicos o constructos de ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos descritas anteriormente. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones y ácidos nucleicos más adecuados. Dicha amplificación conduce a una integración de más copias de ácidos nucleicos que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma en el genoma de la célula huésped que sin cultivo con antifolato/metotrexato o que sin la introducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una variante de DHFR resistente al antifolato, en particular un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 y/o conduce a una producción aumentada de la composición molecular de proteína/anticuerpo.

Dicha célula huésped para amplificación del ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma, que fue introducida en dicha célula huésped en la que al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, fue introducido, como se describe en otras partes de la presente memoria incluyendo sus realizaciones preferidas, son de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente la célula o línea celular KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, más preferiblemente la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, e incluso más preferiblemente la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

Dicha célula huésped puede ser cultivada con al menos dos rondas sucesivas de antifolato/metotrexato, por lo que la concentración de antifolato/metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva. Dicha célula huésped se puede cultivar con al menos tres, más preferiblemente con cuatro, más preferiblemente con 5, e incluso más preferiblemente con 6 rondas sucesivas de antifolato/metotrexato, por lo cual la concentración de antifolato/metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva. Incluso más preferidas son concentraciones de antifolato/metotrexato entre aproximadamente 20 nM y 3.000 nM, más preferidas entre aproximadamente 50 nM y 2.000 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 100 nM y 2.000 nM, e incluso más preferidas de aproximadamente 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1.000 nM, 2.000 nM, que en la realización preferida se usan en rondas sucesivas que se inician a partir de 100 nM.

Es sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de DHFR resistente al antifolato y preferiblemente al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 permite la amplificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped de origen leucémico mieloide humano, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo con antifolato/metotrexato.

Es especialmente sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido de secuencia #1 permite la amplificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo con metotrexato.

Es incluso más sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 permite una amplificación incluso adicional de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo de dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato por lo que la concentración de metotrexato es aumentada en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva.

Es incluso más sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 permite una amplificación incluso adicional de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-

H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo de dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato por lo que la concentración de metotrexato es aumentada en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva.

5 En una realización preferida, el término que la amplificación es estable significa que conduce a la producción de altos rendimientos de la composición molecular de anticuerpo sobre al menos 35 generaciones de ciclos de división de la célula huésped. La amplificación de dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos introducidos de manera estable que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o fracción de la misma puede ser realizada como se describe anteriormente y en los ejemplos usando metotrexato.

15 En una realización preferida de la invención la célula huésped con ácidos nucleicos introducidos se usa preferiblemente después de al menos una ronda de clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo. Preferiblemente dicha clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo ocurre después de al menos una ronda de amplificación con metotrexato descrita en otras partes de la presente memoria. En una realización preferida adicional, dichos clones celulares son amplificados adicionalmente por al menos una ronda adicional de amplificación con metotrexato, preferiblemente una concentración aumentada de metotrexato, preferiblemente al menos aproximadamente la concentración doble de metotrexato, e incluso más preferido seguido de una ronda adicional de clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo. Con estas realizaciones preferidas se pueden seleccionar clones celulares con rendimientos de expresión particularmente altos.

25 De acuerdo con la presente invención el término cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo o una formulación respectiva para proteínas en general significa que la célula huésped de la invención que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo, preferiblemente las realizaciones preferidas de dicho ácido nucleico descritas en otras partes de la presente memoria, se cultiva en condiciones de cultivo que permiten la expresión de la molécula de proteína/anticuerpo en forma de una composición molecular de proteína/anticuerpo, preferiblemente la secreción en el medio, preferiblemente con altos rendimientos y/o alta actividad y/o alta homogeneidad como se describe en otras partes de la presente memoria. Los expertos en la técnica pueden seleccionar las condiciones de cultivo más adecuadas usando medios adecuados y condiciones de cultivo tales como, pero no limitadas a, tiempo adecuado, temperatura, pH, gasificación, alimentación, medio, suplementos del medio, tamaños de recipiente o reactor y principios conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones más adecuadas. Se describen realizaciones preferidas en los ejemplos, pero no se limitan a estos.

40 El cultivo de las células de la presente invención se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos de cultivo generales para células animales capaces de producir eficazmente la composición molecular de anticuerpo deseada, por ejemplo, cultivo por lotes, cultivo por lotes repetidos, cultivo por lote alimentado y cultivo por perfusión. Preferiblemente, se emplea cultivo por lote alimentado o cultivo por perfusión, a fin de elevar la productividad de los polipéptidos deseados.

45 En una realización preferida adicional de la invención dicho cultivo se realiza en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido con medios exentos de proteínas o medios exentos de componentes animales.

50 La adaptación de las células huésped de la presente invención a un medio exento de suero de acuerdo con la presente invención es sorprendentemente rápida y robusta. La adaptación se puede llevar a cabo, por ejemplo, adaptando células subcultivadas en un medio que contiene suero directamente a un medio exento de suero disponible en el mercado, o por adaptación continua, en donde la adaptación directa a medio exento de suero es preferida y ventajosa. Durante el proceso de adaptación a un medio exento de suero, la viabilidad de las células disminuye temporalmente, lo que causa a veces la extinción de las células. Por lo tanto, se prefiere inocular las células en un medio para la adaptación a un medio exento de suero a una densidad celular de 1×10^5 a 5×10^5 células/ml, preferiblemente 2×10^5 células/ml, a fin de restaurar la viabilidad de las células o mantenerla alta. Después de 4 a 7 días de cultivo, las células cuya densidad alcanzó 5×10^5 a 10×10^5 células/ml se seleccionan como las células adaptadas a un medio exento de suero. La adaptación a un medio exento de suero también se puede realizar por dilución sucesiva del medio suplementado con FCS mediante una composición de medio exento de suero (adaptación continua). Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones más adecuadas. Se describen realizaciones preferidas en los ejemplos, pero no se limitan a estos.

60 Después de que las células se han adaptado a un medio exento de suero, se puede preparar una línea celular clonada usando el método de dilución limitante con una placa de 96 pocillos, el método formador de colonias, o similares, y se seleccionan las células o línea celular en base a las propiedades de esas células que son ventajosas en comparación con su célula o línea celular parental, tales como, pero no limitadas a, tiempos de doblado más cortos, crecimiento más rápido, posibilidad de crecer bajo densidades más altas, pueden producir más, eficacias de clonación más altas, eficacias de transfección más altas para ADN, tasas de expresión más altas de composiciones

moleculares de anticuerpos, actividades más altas para una composición molecular de anticuerpo expresada en las mismas, y/o robustez más alta para aumentar a escala. Los métodos para seleccionar la célula con propiedades ventajosas son conocidos por los expertos en la técnica o descritos en la presente memoria.

5 De acuerdo con la presente invención la expresión aislar dicha composición molecular de anticuerpo o una formulación correspondiente para proteínas significa en general que la composición molecular de proteína/anticuerpo expresada por dicha célula huésped que comprende al menos uno de dichos ácidos nucleicos que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o fracción de la misma descrita en otras partes de la presente memoria se obtiene usando los medios de cultivo después de cultivar o enriquecer o purificar adicionalmente la
10 composición molecular de proteína/anticuerpo o partes de dicha composición molecular de proteína/anticuerpo por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dicha composición molecular de proteína/anticuerpo, en el sentido de la invención, también significa partes de dicha composición molecular de proteína/anticuerpo enriquecidas para ciertas moléculas de proteína/anticuerpo descritas en otras partes de la presente memoria.

15 En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada separando el medio, después del cultivo, de las células y/o el residuo celular, por ejemplo por técnicas de centrifugación.

En una realización preferida adicional de la invención una composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada o enriquecida adicionalmente por ultrafiltración, métodos de precipitación y otros métodos de concentración conocidos por los expertos en la técnica.
20

En una realización preferida adicional de la invención una composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada por purificación de la composición molecular de proteína/anticuerpo por métodos cromatográficos, tales como, pero no limitados a, cromatografía de afinidad usando materiales de afinidad acordes, tales como, pero no limitados a, Proteína A, Proteína G, anticuerpos de isotipo anti-anticuerpo, cromatografía con lectina, anticuerpos contra una cierta etiqueta introducida en la molécula de anticuerpo tal como HIS-tag o myc-tag, o antígeno, o por cromatografía de intercambio iónico, conocida por los expertos en la técnica.
25

Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para purificar o enriquecer proteínas o ciertas glicofomas de proteínas, y pueden ser seleccionados, adoptados, optimizados y usados solos o en combinación con métodos descritos anteriormente por los expertos en la técnica para aislar o purificar adicionalmente, fraccionar o enriquecer la composición molecular de proteína o fracciones de la misma.
30

En una realización preferida de la invención, una composición molecular de anticuerpo de la invención de principalmente IgG es aislada mediante cromatografía con Proteína A con o sin ultracentrifugación previa.
35

En otra realización preferida de la invención una composición molecular de anticuerpo de la invención de principalmente IgM es aislada mediante cromatografía con anticuerpo anti-IgM con o sin ultracentrifugación previa.

40 En otra realización preferida de la invención, una composición molecular de anticuerpo de la invención enriquecida en ciertas glicofomas de la molécula de anticuerpo es aislada por cromatografía de afinidad con lectina con o sin ultracentrifugación previa. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para purificar o enriquecer proteínas o ciertas glicofomas de proteínas, y pueden ser seleccionados, adoptados, optimizados y usados solos o en combinación con métodos descritos anteriormente por los expertos en la técnica para aislar o purificar
45 adicionalmente, fraccionar o enriquecer la composición molecular de proteína o fracciones de la misma.

En una realización preferida la composición molecular de anticuerpo es aislada usando columnas de Proteína A. En otra realización preferida la composición molecular de anticuerpo es aislada usando una columna anti-IgM.

50 De acuerdo con la presente invención, la expresión "actividad aumentada" significa que la actividad de una composición molecular de proteína y/o anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína y/o anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NSO, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón. En la realización preferida de la invención significa que la actividad de una composición molecular de proteína y/o anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína y/o anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. Para anticuerpos, dicha actividad aumentada es una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada o una actividad de unión aumentada.
55

60 En el significado de la invención, "actividad" es también una función o conjunto de funciones realizadas por una molécula de proteína en un contexto biológico. En el significado de la invención, la expresión "actividad aumentada", equivalentes de los contenidos y equivalentes gramaticales de la misma son para entender como una actividad mejorada u óptima con respecto a la aplicación seleccionada, por lo que la actividad podría ser aproximada a un valor limitante, por ejemplo ser minimizada o maximizada, o bien ajustada a un valor medio que representa una actividad más alta o más baja en comparación con la molécula de proteína correspondiente producida por la técnica
65

anterior. Actividad mejorada o aumentada en el sentido de la invención también significa una actividad favorable en el sentido de su significado biológico y/o farmacéutico como semivida en suero mejorada, farmacocinética, estabilidad, actividad biológica, unión, antigenicidad y/o inmunogenicidad. Por ejemplo, la actividad biológica de una composición molecular de proteína podría ser aumentada hasta cierto punto disminuyendo efectos biológicos adversos, p.ej. por la estimulación reducida de efectos inmunes adversos o una inmunogenicidad disminuida.

La actividad de la composición molecular de proteína puede ser determinada en un bioensayo adecuado que sea capaz de determinar la actividad de la proteína. Los expertos en la técnica pueden identificar bioensayos adecuados o construir bioensayos adecuados. Según la presente invención tales bioensayos incluyen por ejemplo ensayos biológicos in vitro, que incluyen ensayos celulares o moleculares o mixtos, tales como ensayos de proliferación, ensayos de apoptosis, ensayos de adhesión celular, ensayos de señalización, ensayos de migración, ensayos de citotoxicidad celular, ensayos de fagocitosis, ensayos de lisis, y ensayos de unión. Tales bioensayos también incluyen ensayos in vivo que usan modelos animales o humanos, tales como biodistribución, ensayo farmacocinético, farmacodinámico, ensayos de semivida en suero, ensayos para biodisponibilidad, ensayo de eficacia, ensayos de localización, ensayos de tratamiento y profilaxis de enfermedades, incluyendo estudios clínicos. Tales bioensayos también incluyen ensayos químicos, físicos, fisicoquímicos, biofísicos y bioquímicos, tales como estabilidad a la temperatura, tensión de cizallamiento, presión, pH, conjugación y otros. Tales bioensayos también incluyen ensayos para la inmunogenicidad y/o antigenicidad para mejorar las propiedades de la composición molecular de proteína con respecto a su uso clínico. Los expertos en la técnica pueden determinar la actividad o una combinación de actividades descritas de composiciones moleculares de proteína.

En una realización preferida la actividad más alta de la composición molecular de proteína se caracteriza por una actividad más alta en al menos un modelo in vitro y/o una actividad más alta en al menos un modelo in vivo y/o una estabilidad más alta y/o una semivida en suero más larga y/o una biodisponibilidad más larga y/o una inmunogenicidad mejorada y/o una antigenicidad mejorada determinadas por al menos un bioensayo. La mejora en la actividad global, que también se llama en la presente memoria actividad más alta, puede conducir por ejemplo a mejoras como dosificaciones más bajas, intervalos de tiempo más largos para la administración, menos efectos secundarios y ninguna o más baja toxicidad del producto cuando se usa en seres humanos u organismos acordes dando como resultado productos farmacéuticos mejorados en gran medida.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína producida por la técnica anterior.

Dicha citotoxicidad celular mediada por Fc es una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada (actividad ADCC), actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (actividad CDC), y/o citotoxicidad causada por fagocitosis (actividad de fagocitosis). La citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, incluyendo actividad ADCC, actividad CDC o actividad de fagocitosis, puede ser determinada por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, y algunos se describen en detalle en los ejemplos sin limitarla a esos métodos, por lo que los métodos descritos en los ejemplos son realizaciones preferidas de la invención.

Dicha actividad de unión aumentada es una unión aumentada al epítipo de la molécula de anticuerpo, tal como el epítipo, el antígeno, otro polipéptido que comprende el epítipo, o una célula que comprende el epítipo de la molécula de anticuerpo, o una unión aumentada al menos a un receptor Fc u otro ligando efector, tal como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRII, y subclases de los mismos tales como Fc-gammaRIIa, Fc-gammaRIIIa, Fc-gammaRIIIb, o el componente Cq1 del complemento, o FcRn o una molécula o célula que comprende cualquiera de estos receptores Fc o ligandos efectores. La actividad de unión aumentada puede ser una afinidad más alta, una avidéz más alta, y/o un número más alto de sitios de unión o combinaciones de los mismos. La actividad de unión aumentada puede dar como resultado diversos efectos y actividades, tales como, pero no limitados a, formas de actividad mediada por receptor como se describen en los antecedentes de la técnica. La afinidad de unión, avidéz y actividad mediada por receptor más altas pueden ser determinadas por al menos uno de los diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como, pero no limitados a, medición con Biacore, análisis de Scatchard, medidas basadas en ELISA o RIA, medidas de citometría de flujo, ensayo para determinar la inducción de apoptosis en células diana adecuadas, ensayos para la determinación de la proliferación de células diana adecuadas, ensayos para el bloqueo antagonístico, agonístico o de receptor de una composición molecular de anticuerpo tales como, pero no limitados a, inhibición de unión mediada por célula-célula, desencadenamiento de eventos moleculares internos celulares. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o adoptar y/o modificar un método adecuado o combinación de métodos para ensayar la afinidad de unión, avidéz, número de sitios de unión y/o actividad mediada por receptor.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para ensayar la capacidad de un anticuerpo para poder obtener una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, preferiblemente actividad ADCC, actividad CDC y/o citotoxicidad causada por fagocitosis, y/o una actividad de unión aumentada al epítipo de la molécula de anticuerpo o preferiblemente al a menos un receptor Fc u otro ligando efector, en general y/o en particular con las células huésped de la invención y sus realizaciones preferidas descritas en otras partes de la presente memoria.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en la misma.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es al menos 50% más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 23 veces, más preferiblemente al menos 30 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, más preferiblemente al menos 75 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 150 veces, más preferiblemente al menos 150 veces, más preferiblemente al menos 230 veces, más preferiblemente al menos 300 veces, más preferiblemente al menos 500 veces, más preferiblemente al menos 750 veces, y lo más preferiblemente más que 1.000 veces.

De este modo, no cada bioensayo tiene que mostrar una actividad más alta, pero dependiendo del uso y los rasgos de una composición molecular de proteína particular, algunos efectos biológicos favorables pueden compensar otros que son menos favorables y dar aún como resultado una actividad global más alta de la composición molecular de proteína en el sentido de la invención. Por ejemplo, una cierta composición molecular de proteína puede dar como resultado una actividad mucho más alta al unirse a sus receptores de células, desencadenando de este modo un efecto secundario, tal como inducción de proliferación, pero mostrar una semivida en suero ligeramente disminuida. En combinación, la actividad más alta que desencadena más el receptor compensa entonces la biodisponibilidad más corta en la bioactividad global. En otro ejemplo, una semivida más corta y una actividad más alta hacia el receptor que se desencadena son ambas ventajosas. En aún otro ejemplo la actividad in vivo no es mejorada pero la estabilidad in vitro mejora la producción y almacenamiento de la composición molecular de proteína. En aún otro ejemplo, se necesita una semivida larga pero una actividad más baja.

En una realización preferida de la invención la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una CDC aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una citotoxicidad aumentada causada por fagocitosis. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad de unión al epítipo aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada, preferiblemente FcγRIIIA. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada y una actividad de unión al epítipo aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada y una actividad de unión al epítipo aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada, una actividad CDC aumentada, una actividad de unión al epítipo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada, citotoxicidad causada por fagocitosis aumentada, una actividad de unión al epítipo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada. En la realización más preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una ADCC aumentada, citotoxicidad aumentada causada por fagocitosis, una actividad CDC aumentada y una actividad de unión al epítipo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada.

De acuerdo con la presente invención, el término "homogeneidad mejorada" significa que una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención comprende menos glicofomas diferentes, o más de una glicofoma favorable o de glicofomas favorables, o menos de al menos una glicofoma de una molécula de anticuerpo (preferiblemente en aquellas glicofomas que representan al menos 1% de la composición molecular de anticuerpo total en sí misma) que al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida de la invención, significa que una composición molecular de anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención comprende menos glicofomas diferentes, o más de una glicofoma favorable o de glicofomas favorables, o menos de al menos una glicofoma de una molécula de anticuerpo que una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Una heterogeneidad particularmente problemática para la producción y uso en el ser humano es la sialilación. En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo de la invención tiene una homogeneidad mejorada al no comprender glicofoma con el ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), por lo cual en este

caso sin glicofoma significa ninguna glicofoma de más que 1% de todas las cadenas de carbohidratos obtenibles de la composición molecular de anticuerpo purificada y más preferiblemente sin cadena de carbohidrato detectable en absoluto como es detectable por los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dado que se sabe que NeuGc puede ser inmunogénico en seres humanos, esta es una gran ventaja de las células huésped de la invención sobre otros sistemas de producción tales como CHO, NSO, SP2/0.

En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo tiene una homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación por comprender menos que 5% de glicofomas, más preferiblemente menos que 3%, incluso más preferiblemente menos que 1%, y lo más preferiblemente ninguna glicofoma de la composición molecular de proteína/anticuerpo con ácido siálico detectable como se describe en los ejemplos. En una realización preferida adicional se consigue una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un defecto en la ruta de precursores de nucleótidos de azúcar y por lo tanto es deficiente para o tiene CMP-ácido siálico reducido, lo que da como resultado ninguna sialilación o reducida en gran medida de las cadenas de azúcar carbohidratos de las moléculas de proteína/anticuerpo cuando las células son cultivadas en un medio exento de suero. En una realización incluso más preferida tal composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación puede ser conseguida usando NM-F9 [DSM ACC2606] o NM-D4 [DSM ACC2605] como una célula huésped de la invención cultivada en un medio exento de suero como se describe en más detalle en los ejemplos.

En otra realización preferida adicional una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un defecto en el transportador de nucleótidos de azúcar de GMP-ácido siálico o en al menos una sialiltransferasa, lo que da como resultado ninguna sialilación o reducida en gran medida de las cadenas de azúcar carbohidrato de las moléculas de proteína/anticuerpo cuando las células son cultivadas en un medio exento de suero. Son ejemplos NM-F9, NM-D4 y GT-2X.

En otra realización preferida adicional una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un grado de sialilación aumentado. Dicho grado de sialilación significa que la cantidad del ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc o NeuNAc) en las moléculas de proteína/anticuerpo en una composición molecular de proteína/anticuerpo es al menos 5%, más preferiblemente al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 25 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, y lo más preferiblemente al menos 100 veces, más alta que la cantidad del ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc o NeuNAc) de las unidades carbohidrato totales o la cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína/anticuerpo cuando se comparan con la misma cantidad de moléculas de proteína/anticuerpo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas. El grado de sialilación puede ser detectado por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como, pero no limitados a, análisis inmunoblot o ELISA usando lectinas cuya unión depende de la sialilación de la estructura de carbohidrato, tales como SNA, MAL, MAL I o PNA, por métodos de detección química tales como el método del ácido tiobarbitúrico, por HPLC o espectrometría de masas o combinación de los mismos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar el método más adecuado y adoptarlo y optimizarlo para este fin, y se describen más detalles en los ejemplos. Se prefiere un análisis inmunoblot usando SNA.

Se puede conseguir una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas, y lo más preferiblemente K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X que tiene un grado de sialilación aumentado, y da como resultado una composición molecular de proteína/anticuerpo que comprende ácido siálico enlazado en alfa 2-6, detectable por ejemplo por unión a SNA, en una versión más preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo comprende ácidos siálicos enlazados en alfa 2-6 y alfa 2-3.

Se puede conseguir una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir NeuNAc en enlace alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir NeuNAc en alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como, pero no limitadas a, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas, dando como resultado una composición más preferida de glicofomas de la molécula de proteína/anticuerpo en la composición molecular de proteína/anticuerpo.

En una realización incluso adicional (preferida) de la invención dicha composición molecular de anticuerpo de la invención con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación comprende al menos una glicofoma de una molécula de anticuerpo con al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio (dominio Cgamma2) de la región Fc.

La anterior composición molecular de anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación se expresa en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que tiene un grado de sialilación aumentado y/o comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en enlace alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas.

En una realización incluso más preferida la anterior molécula de anticuerpo tiene al menos un sitio de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro) y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab.

En una realización preferida adicional la composición molecular de anticuerpo de la invención con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación que comprende una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo distinto al aminoácido Asn-297 en el segundo dominio (dominio Cgamma2) de la parte Fc tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas, o preferiblemente en seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, NM-F9, NM-D4 o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas.

La biodisponibilidad de los anticuerpos puede ser optimizada usando la presente invención. La expresión de moléculas de anticuerpo en particular en células que tienen una alta o incluso una sialilación muy alta (grupos 1 y 3 discutidos anteriormente) puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad prolongada, mientras que la expresión de moléculas de anticuerpo en las células del grupo 2 puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad prolongada, mientras que la expresión de moléculas de anticuerpo en las células del grupo 2 puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad comparablemente acortada. La biodisponibilidad puede ser ensayada como conocen los expertos en la técnica, y como se describe en los ejemplos usando animales o preferiblemente seres humanos. Los animales incluyen ratones, ratas, conejillos de indias, perros o monos, pero no están restringidos a esas especies. Debido a la naturaleza humana se prefieren aquellos animales que tienen una glicosilación y de manera más importante sialilación más cercana a la humana, lo más preferido son seres humanos.

La composición molecular de anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación se expresa en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que tiene un grado de sialilación aumentado y/o comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en enlace alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, y células o líneas celulares derivadas de las mismas, y comprende al menos una cadena de carbohidrato unida al menos a un sitio de N-glicosilación y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab de la molécula de anticuerpo, y tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas, o preferiblemente en seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida adicional la molécula de anticuerpo expresada es Erbitux (Cetuximab).

De acuerdo con la presente invención la expresión "rendimiento aumentado" significa que el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo producida en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alto que el rendimiento medio o máximo respectivo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón. En la realización preferida de la invención significa que el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alto que el rendimiento medio o máximo respectivo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usando el gen murino dhfr y metotrexato para la amplificación en CHOdhfr-. El rendimiento medio y máximo se mide en SPR, que refleja la productividad de una célula, mezcla celular o una línea celular, puede ser determinado por los expertos en la técnica, y se describe en su realización preferida en los ejemplos.

Al menos el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular

derivada de las mismas, es al menos 10% más alto que el correspondiente de la composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usando el gen murino dhfr y metotrexato para la amplificación en CHOdhfr-, más preferiblemente al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, más preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, y lo más preferiblemente más que 5 veces.

Además se describe un ácido nucleico, que comprende

- (a) una secuencia que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y
- (b) al menos una secuencia que codifica una secuencia del grupo de secuencia #1 a secuencia #9.

El ácido nucleico puede comprender

- (a) una secuencia que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y
- (b) una secuencia que codifica la secuencia #1.

El ácido nucleico descrito anteriormente puede comprender además una secuencia que codifica un marcador de selección, preferiblemente una secuencia que codifica para un polipéptido que induce una resistencia a antibióticos de una célula huésped en la que dicho ácido nucleico es introducido, tal como, pero no limitado a, neomicina o puromicina.

El ácido nucleico descrito anteriormente puede comprender además al menos una secuencia de al menos un elemento genético descrito en otras partes de la presente memoria.

Se describe además una célula huésped de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano o una mezcla de células o líneas celulares que comprende al menos una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, o célula, células o línea celular que fue obtenida fusionando al menos una célula, células o una línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano, con otra célula de origen humano o animal, tal como, pero no limitada a, linfocitos B, células CHO, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma que fue introducido en dichas células.

La célula huésped descrita anteriormente puede comprender al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma.

La célula huésped puede ser K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, preferiblemente aquellas que crecen en condiciones exentas de suero y de las que se aísla una composición molecular de proteína/anticuerpo en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo fue introducido en condiciones exentas de suero, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria.

La célula huésped descrita anteriormente puede comprender al menos un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1.

La célula huésped descrita anteriormente puede comprender al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o partes de la misma y al menos un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1.

La célula huésped puede ser K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, preferiblemente aquellas que crecen en condiciones exentas de suero y de las que se aísla una composición molecular de proteína/anticuerpo en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo fue introducido en condiciones exentas de suero, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma,

preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y al menos una secuencia que codifica una secuencia del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1.

5 En las células huésped descritas anteriormente la molécula de anticuerpo codificada puede ser un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423.

10 En las células huésped descritas anteriormente la molécula de anticuerpo codificada puede ser el anticuerpo PankoMab [Cancer immunol. Immunother. 2006 Nov;55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], preferiblemente una forma quimérica de PankoMab con todos los dominios constantes humanos, y más preferiblemente un PankoMab humanizado.

15 Se describe además una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana producida por cualquiera de los métodos descritos en alguna parte de la presente memoria.

20 Una composición molecular de proteína/anticuerpo producida por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana producida por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria cuando se compara con una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NSO, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

25 La molécula de proteína o parte de la misma expresada puede ser cualquier proteína o parte de proteína o fragmento de proteína. La molécula de anticuerpo o parte de la misma expresada puede ser cualquier anticuerpo o parte de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

30 Las composiciones moleculares de proteína se pueden usar para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades, tales como leucemia, neutropenia, citopenia, cáncer, trasplante de médula ósea, enfermedades de sistemas hematopoyéticos, infertilidad y enfermedades autoinmunes. El espectro de aplicaciones terapéuticas conocidas por las personas del campo de la técnica de las composiciones moleculares de proteína es muy amplio. Por ejemplo, G-CSF es un importante terapéutico para tratar la neutropenia, una disminución de los neutrófilos peligrosa para la vida como consecuencia de una quimioterapia de pacientes de cáncer leucémico. GM-CSF se usa específicamente para el tratamiento de pacientes de AML en edad relativamente alta después de quimioterapia para conseguir una rápida recuperación de la neutropenia. GM-CSF está adicionalmente aprobado como terapéutico para varias aplicaciones en trasplantes de médula ósea y para inmovilización de células madre sanguíneas periféricas. Además, hay varias aplicaciones clínicas de GM-CSF que están actualmente en investigación, tal como para el tratamiento de HIV y cáncer. Ciertas enfermedades del sistema hemtopoyético se tratan con EPO, y IFN-beta es actualmente un importante terapéutico para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune. Otro ejemplo es FSH, que se usa ampliamente para el tratamiento de la infertilidad masculina y femenina. La hCG también se aplica para el tratamiento de la infertilidad, pero centrándose en la anovulación en las mujeres. hGH tiene beneficios probados clínicamente, tales como reducción de la grasa corporal y aumento del tejido muscular.

45 Las composiciones moleculares de proteína también se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades seleccionadas del grupo que comprende leucemia, neutropenia, citopenia, cáncer, trasplante de médula ósea, enfermedades de sistemas hematopoyéticos, infertilidad y enfermedades autoinmunes.

50 En una realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo expresada es una molécula de anticuerpo que reconoce psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedades autoinmunes, SLE, esclerosis múltiple, trastornos hematológicos autoinmunes, asma, alergia, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de aloinjertos, cirugía de glaucoma, infarto de miocardio, virus tales como RSV, HIV, Hep B, o CMV, cáncer, sarcoma, CLL, AML o NHL.

55 En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo expresada es una molécula de anticuerpo que reconoce el cáncer, tumor o metástasis, al menos una célula de cáncer o célula de tumor, en al menos un ser humano, seleccionado preferiblemente del grupo de enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales de la región oído-nariz-garganta, de los pulmones, mediastino, sarcomas, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas del sistema nervioso central, enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales durante la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tumor primario desconocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneales, malignidades relacionadas con inmunosupresión y/o metástasis de tumor.

60 En una realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo o parte de la misma es un anticuerpo anti MUC1.

65 En una realización preferida adicional de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o

ácidos nucleicos es el anticuerpo Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1 H o anticuerpos derivados de los mismos.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/05070 e incluso más preferida de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, e incluso más preferido PankoMab [Cancer immunol. Immunother. 2006 Nov;55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], e incluso más preferido una forma quimérica del mismo que comprende todos los dominios constantes humanos, e incluso más preferido un anticuerpo humanizado del mismo.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, por lo que la composición molecular de anticuerpo aislada de cualquier célula huésped, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, no comprende NeuGc detectable. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero o una molécula de anticuerpo que comprende el dominio Cgamma2, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, por lo que la composición molecular de anticuerpo aislada de una célula huésped, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, comprende al menos una glicofoma con ácido alfa 2-6 siálico. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero o una molécula de anticuerpo que comprende el dominio Cgamma2, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1 H, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, por lo que la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, comprende ácido alfa 2-6 siálico, que es detectable por análisis inmunoblot con la lectina SNA como se describe en los ejemplos. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier molécula de anticuerpo, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1H, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped NM-F9 o NM-D4 después del cultivo en medio exento de suero y más preferiblemente exento de proteínas tiene una homogeneidad mejorada, con ácidos siálicos no detectables. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

En una realización preferida adicional de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es el anticuerpo Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1H, o anticuerpos derivados de los mismos, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una actividad ADCC aumentada de al menos 4 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una actividad ADCC aumentada de al menos 4 veces más alta cuando se produce en al menos una de las células K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped tiene una actividad de unión a su epítipo aumentada de al menos 50% más alta, preferiblemente 2 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente

PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped NM-F9 o NM-D4 después del cultivo en medio exento de suero y más preferiblemente exento de proteínas tiene una homogeneidad mejorada, con ácidos siálicos no detectables. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

5 En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped tiene una homogeneidad mejorada con al
10 menos 10% más ácidos siálicos que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

15 En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una homogeneidad mejorada con un grado más alto de ácidos siálicos no detectables cuando se expresa en NM-F9 o NM-D4 cuando se compara con una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

20 En otra realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una homogeneidad mejorada como se describe anteriormente, y una actividad ADCC aumentada de al menos 4 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].
25

30 En la realización más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab.

35 Se describe además una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención descrito en otras partes de la presente memoria, en donde la célula huésped es cualquier célula, células, o línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide humana que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una célula de origen leucémico mieloide humano, o una célula o línea celular derivada de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una de esas células mencionadas anteriormente.
40

45 También se describe una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención descrito en otras partes de la presente memoria, en donde la célula huésped es cualquier célula, células, o línea celular que se obtuvo fusionando al menos una célula, células, o línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide humana que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano, con otra célula de origen humano o animal, tales como, pero no limitadas a, linfocitos B, células CHO.

50 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al
55 menos una de esas células mencionadas anteriormente.

60 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas.

65 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular

derivada de las mismas o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria.

5 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero, y preferiblemente aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y una composición molecular de anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

15 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero.

20 Dicha célula huésped puede proporcionar producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero y en la que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y una composición molecular de proteína/anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

30 En la realización más preferida dicha célula huésped proporciona producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero, preferiblemente aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y la composición molecular de proteína/anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

35 Una composición de proteína/proteína puede ser aislada por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria.

40 Una composición molecular de proteína puede ser aislada por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria, que tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención y descrita en otras partes de la presente memoria.

45 En una realización preferida adicional de la invención la molécula de proteína o parte de la misma tiene un tamaño de al menos 10 kDa, preferiblemente un tamaño de al menos 15 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 20 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 25 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 30 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 35 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 40 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 45 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 50 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 55 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 60 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 65 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 70 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 75 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 80 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 85 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 90 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 95 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 100 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 105 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 110 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 115 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 120 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 125 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 130 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 135 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 140 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 145 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 150 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 155 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 160 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 165 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 170 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 175 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 180 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 185 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 190 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 195 kDa, lo más preferiblemente un tamaño de al menos 200 kDa.

En una realización preferida de la invención dicha composición molecular de proteína se origina a partir de cualquiera de las moléculas de proteína del grupo de las citocinas y sus receptores, por ejemplo los factores de necrosis tumoral TNF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotropinas, p.ej. hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteneizante (LH), tirotrófina, y gonadotropina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocinasa, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrófina-3, -4, -5, -6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs), p.ej. M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), p.ej. IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadhesinas; Glicoforina A; MUC1.

En una realización más preferida de la invención dicha composición molecular de proteína se origina a partir de cualquiera de las moléculas de proteína del grupo de Glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferones, interleucinas, anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

También se describe una proteína de glicol o composición de proteína obtenible por los métodos de producción según la presente invención. Dicha proteína tiene preferiblemente las características de glicosilación definidas en la presente memoria.

Preferiblemente, dicha composición de proteína es una composición molecular de anticuerpo. Se puede aislar una composición molecular de anticuerpo por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria que tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención y descrito en otras partes de la presente memoria.

Ejemplos de tales anticuerpos incluyen anticuerpos contra gangliósido GD3, cadena alfa del receptor de interleucina-5 humana, HER2, quimiocina CC receptora 4, CD20, CD22, neuroblastoma, MUC1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En una realización preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptin, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Cetuximab (Erbix), Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, Campath-1H, C2B8, Panorex, BrevaRex, Simulect, Antova, OKT3, Zenapax, ReoPro, Synagis, Ostavir, Protovir, OvaRex, Vitaxin.

En una realización más preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de Rituximab, Herceptin, anticuerpo anti-quimiocina CC receptora 4 KM2160, Campath-1H, C2B8, Erbitux, anticuerpo anti-neuroblastoma chCE7. En una realización incluso más preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, más preferiblemente su forma quimérica e incluso más preferiblemente su forma humanizada.

También se describe una proteína o composición de proteína obtenible por el método de producción de la presente invención, en donde la proteína es un anticuerpo que se une al epítipo de MUC1, que comprende la secuencia de aminoácidos DTR.

MUC1 es un marcador tumoral establecido expresado en diversos tumores epiteliales, y es una diana tumoral potencial. MUC1 es una glicoproteína transmembrana grande, altamente O-glicosilada. La porción extracelular consiste en un número variable de 20 a 120 repeticiones tándem (TR), cada una de las cuales consiste en 20 aminoácidos con cinco sitios de O-glicosilación potenciales. MUC1 no sólo se expresa en tejidos epiteliales sino también en células hematopoyéticas. Se conocen varios anticuerpos que se unen al motivo DTR de MUC1 que son también proteínas/anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención (para una visión en conjunto véase Karsten et al, 1998). Karsten también describió un nuevo epítipo conformacional inducido por carbohidratos en MUC 1 (TA MUC) de la estructura ...PDT*RP... donde T* es O glicosilado. Los glicanos presentes en este sitio son en sí estructuras de carbohidrato específicas a tumores.

Por tanto, es deseable usar un anticuerpo MUC que pueda discriminar entre el epítipo tumoral TA MUC y el epítipo no glicosilado. Un anticuerpo adecuado capaz de reconocer específicamente el epítipo TA MUC glicosilado es el anticuerpo PankoMab. Su producción se describe en detalle en Danielczyk et al 2006, incorporado totalmente en la presente memoria por referencia (PankoMab: a potent new generation anti-tumor MUC-1 antibody). Se usa preferiblemente el anticuerpo PankoMab o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítipo TA-MUC 1 como anticuerpo PankoMab parental. Tal variante de anticuerpo tiene al menos una de las siguientes características:

- se une a un epítipo que comprende al menos la secuencia de aminoácidos PDTRP;
- se une a un péptido MUC corto de 30 aminoácidos que comprende 1,5 TRs cuando está glicosilado con Gal-Nacalfa en la secuencia PDTRP pero no si el mismo péptido no está glicosilado;
- muestra un efecto de longitud aditiva de más que 25, preferiblemente 28 (lo más preferiblemente una relación de 29,5);
- presenta una baja o incluso ninguna unión a células del sistema hematopoyético (con respecto al método de detección, por favor véase Danielczyk et al 2006, incorporado en la presente memoria por referencia);
- tiene una alta afinidad hacia células tumorales que varía de aproximadamente al menos $K_{ass} = 0,2 - 1 \times 10^9 M^{-1}$ determinada por análisis de representación Scatchard.

Se dan ejemplos de variantes respectivas en los ejemplos. El anticuerpo puede ser de origen murino, quimérico o humanizado.

El anticuerpo que se une al epítipo TA-MUC 1, preferiblemente el anticuerpo PankoMab o los anticuerpos Panko 1 y Panko 2 descritos en la presente memoria, tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

- (i) tiene un grado de sialilación aumentado con al menos una cantidad 15% más alta de ácido N-acetilneuramínico en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que la misma cantidad de moléculas de anticuerpo de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;
- (ii) tiene un grado de galactosilación más alto con al menos una cantidad 5% más alta de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que la misma cantidad de moléculas de anticuerpo de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;
- (iii) comprende una cantidad detectable de bisecGlcNAc;
- (iv) no tiene o tiene menos que 2% de estructuras de manosa híbridas o altas.

Un patrón de glicosilación respectivo da como resultado el siguiente patrón de actividad sorprendente y beneficioso:

- (i) una actividad CDC que es más que 15% más alta que la actividad del mismo anticuerpo expresado en células CHO;
- (ii) una semivida en suero que es alargada en un factor 2 (más que 1,5) en comparación con un anticuerpo que no lleva sialilación detectable;
- (iii) tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Se puede obtener un anticuerpo respectivo produciéndolo en líneas celulares según la presente invención que proporcionan un alto grado de sialilación y galactosilación, pero preferiblemente una fucosilación más baja. Son ejemplos adecuados NM-H9D8 y NM-H9D8-E6.

Las siguientes tablas y figuras ilustran la presente invención.

Las siguientes tablas 1 y 8 y figuras 1 a 17 ilustran la presente invención.

Tabla 1: Rendimiento de PankoMab quimérico expresado en CHOdhfr- y NM-F9 cultivadas en medio suplementado con FCS.

Tabla 2: Rendimiento de PankoMab quimérico expresado en NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivada en medio exento de suero.

Tabla 3: Cuantificación del contenido de ácido siálico en PankoMab y CetuxiMab: los anticuerpos fueron producidos por la línea celular indicada y cuantificados integrando el área de pico obtenida por cromatografía de fase inversa de las variantes de ácido siálico marcadas con DMB. NeuGc y NeuAc fueron diferenciadas usando un patrón de ácido siálico.

Tabla 4: Cuantificación de las estructuras diferentemente cargadas en Panko 1 y PankoMab: los N-glicanos

marcados con 2-AB fueron sometidos a cromatografía de intercambio aniónico (columna Asahi-PAK) y los picos correspondientes a las estructuras diferentemente cargadas fueron cuantificadas por integración.

Tabla 5: El grado de galactosilación de los anticuerpos Panko1 y PankoMab se determinó por HPLC de aminofase (columna Luna-NH2) de los glicanos marcados con 2-AB. Los picos fueron cuantificados por integración y la estructura de glicano subyacente se analizó por espectroscopía de masas.

Tabla 6: Cuantificación de las estructuras triantenaria y biantenaria+biseccionada en Panko1 y PankoMab. Las fracciones que contienen GlcNAc potencialmente biseccionantes de la aminofase-HPLC se recogieron y sometieron a una cromatografía de fase inversa (columna RP-18). Mediante esto las estructuras triantenaria y biantenaria+biseccionada pueden ser distinguidas. El grado de fucosilación de los anticuerpos se determinó por HPLC de aminofase (columna Luna-NH2) de los glicanos marcados con 2-AB. Los picos fueron cuantificados por integración y la estructura de glicano subyacente se analizó por espectroscopía de masas. Se determinaron las estructuras fucosiladas y no fucosiladas y se cuantificaron las áreas de pico integradas.

Tabla 7: Rendimiento de hFSH expresado en CHOdhfr- y GT-2x cultivadas en medio suplementado con FCS (CHOdhfr-) o medio exento de suero.

Tabla 8: Rendimiento de hFSH expresado en NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivada en medio exento de suero.

Tabla 9: Combinaciones de actividad y glicosilación adecuadas obtenibles con el método descrito en la presente memoria.

Tabla 10: Valores obtenidos de bisecGlcNAc y fucosa en diferentes líneas celulares.

Figura 1: Expresión fut8 mRNA de la célula NM-F9, NM-D4 y NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Como control sirvieron células HepG2.

Figura 2: Ensayo de liberación en europio con Cetuximab aislado de células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- o células SP2/0 contra células LS174T como células diana. El ensayo se incubó durante 4 h a una relación efector a célula diana de 50:1 con concentraciones de anticuerpo de 0 a 100 ng/ml.

Figura 3: La actividad ADCC de PankoMab quimérico aislado de NM-F9 es ~5 veces más alta que el PankoMab quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 4: Ensayo de liberación en europio con Panko1 quimérico aislado de células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- y células NM-H9D8 contra células ZR-75-1 como células diana. El ensayo se incubó durante 4 h a una relación efector a célula diana de 80:1 con concentraciones de anticuerpo de 0 a 1 µg/ml.

Figura 5: Actividad ADCC de Panko2 quimérico en un ensayo de liberación en europio contra células ZR-75-1 después de incubación durante una noche con una relación efector a célula diana de 50:1 y 5.000 células diana por pocillo. Las muestras se incubaron por triplicado.

Figura 6: Actividad ADCC de Panko2 quimérico en un ensayo de liberación en europio contra células ZR-75-1 después de incubación durante una noche con una relación efector a célula diana de 50:1 y 10.000 células diana por pocillo. Las muestras se incubaron por triplicado.

Figura 7: Ensayo CDC con PankoMab quimérico contra ZR-75-1.

Figura 8: La actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de NM-F9 al péptido MUC1 30-mer glicosilado sintético es aproximadamente 50% más alta que la actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 9: La actividad de unión del Panko2 quimérico aislado de GT-2x y NM-H9D8 al péptido MUC1 30-mer glicosilado sintético es aproximadamente 50% más alta que la actividad de unión del Panko2 quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 10: Se realizó análisis Western blot para identificar la diferentemente sialilada cadena pesada de composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas por anticuerpos IgG anti-humanos secundarios (Fig. 10A) o bien SNA (Fig. 10B) que detecta sialilación 2-6.

Figura 11: Se realizó análisis Western blot para identificar la diferentemente sialilada cadena pesada de composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr- o NM-H9D8. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas por SNA que detecta sialilación 2-6.

Figura 12: Se realizó análisis ELISA para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr-, GT-2x, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6.

Figura 13: Se realizó análisis ELISA para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de Cetuximab expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8. La sialilación fue analizada (A) por SNA, que detecta sialilación alfa2-6 con o sin tratamiento con neuraminidasa y (B) por MAL I, que detecta sialilación alfa2-3.

Figura 14: Puntos "dot blots" teñidos por SNA de los anticuerpos quiméricos Panko1 y Panko2 aislados de células CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6.

Figura 15: El PankoMab quimérico aislado de células NM-H9D8 está disponible en el suero de ratones desprovistos de sistema inmune más tiempo que el aislado de NM-F9.

Figura 16: Análisis SDS-Page de hFSH producida en NM-F9 (calle 1) y GT-2x (calle 2). 5 µg de hFSH purificada fueron separados por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras por calle y teñidas por Azul Brillante de Coomassie. El Marcador indica un intervalo de 21-108 kD.

Figura 17: Se realizó análisis Western blot para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de hFSH. 1 µg de composición molecular de hFSH de CHO (calle 1) y GT-2x (calle 2) fueron separados por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas con SNA que detecta la sialilación 2-6.

Figura 18: muestra un anticuerpo IgG, en donde los N-glicanos están unidos covalentemente en un residuo Asn 297 conservado en el dominio C_H2 de Fc. Como se indicó, pueden haber oligosacáricos N-enlazados adicionales en el dominio Fab, que pueden incluso influir en la actividad de unión del anticuerpo. Se muestran las estructuras de glicano sólo en una mitad del anticuerpo. El carbohidrato Fc es una estructura de cadena ramificada que está situada principalmente dentro de los dos dominios C_H2, con un brazo/antena de cada oligosacárido interactuando con las áreas hidrófobas de los dominios C_H2. El análisis estructural de IgGs humanos policlonales y de mieloma ha demostrado que el Fc contiene diversas cantidades de una estructura central biantenaria base, como se demuestra en la Fig. 18. El significado de los símbolos se muestra en la tabla correspondiente. Dicha estructura central puede contener ninguno (G0), uno (G1) o dos (G2) residuos de galactosa terminales y/o un residuo GlcNAc bisectora y/o un residuo de fucosa en la GINAc proximal. También pueden estar presentes más moléculas de fucosa en los otros residuos GlcNAc o los residuos de galactosa. La diversidad es aumentada incluso, ya que el ácido siálico terminal puede estar presente o no dependiendo de las propiedades del anticuerpo, ya que se reportó que el ácido siálico tiene un impacto negativo sobre ADCC.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Glycotope GmbH
- <120> Sistema de producción totalmente humano de alto rendimiento para anticuerpos y proteínas mejorados
- <130> 52 916 K
- <150> PCT/EP2007/007877
- 20 <151> 2007-09-10
- <160> 21
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 187
- 25 <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Variante de DHFR resistente a MTX
- <400> 1

ES 2 620 261 T3

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asp Met Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Trp
 20 25 30
 Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45
 Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60
 Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
 85 90 95
 Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
 100 105 110
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
 115 120 125
 Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 185

<<210> 2

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 2

ES 2 620 261 T3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ser
 20 25 30
 Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45
 Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60
 Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95
 Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125
 Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 3

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 3

ES 2 620 261 T3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ala
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 4

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

ES 2 620 261 T3

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Gly
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 5

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 5

ES 2 620 261 T3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Tyr Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 6

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 6

ES 2 620 261 T3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 7

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 7

ES 2 620 261 T3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45
 Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60
 Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95
 Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125
 Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 8

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 8

ES 2 620 261 T3

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45
 Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60
 Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
 85 90 95
 Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
 100 105 110
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
 115 120 125
 Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 185

<210> 9

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Variante de DHFR resistente a MTX

<400> 9

ES 2 620 261 T3

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Tyr Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45
 Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60
 Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
 85 90 95
 Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
 100 105 110
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
 115 120 125
 Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 185

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> péptido señal de secreción

<400> 10

Met Trp Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15

10 Ser Ala

<210> 11

ES 2 620 261 T3

<211> 117

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

5 <223> cadena pesada variable del anticuerpo Panko -1

<400> 11

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 12

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> cadena ligera variable del anticuerpo Panko 1

<400> 12

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

15

ES 2 620 261 T3

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

<210> 13

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> cadena pesada variable del anticuerpo Panko 2

<400> 13

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Thr Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg His Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser
 115

ES 2 620 261 T3

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Desconocido

5 <220>

<223> cadena ligera variable del anticuerpo Panko 2

<400> 14

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1          5          10          15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20          25          30
Asn Gly Ile Thr Tyr Phe Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Leu Ser
35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85          90          95
Leu Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100         105         110
    
```

Arg

10 <210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

15 <223> cadena pesada variable del anticuerpo Cetuximab

<400> 15

ES 2 620 261 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> cadena ligera variable del anticuerpo Cetuximab

<400> 16

ES 2 620 261 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador para la cadena alfa de FSH

<400> 17

aaaggtacca tggattacta cagaaaatat g 31

10 <210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador para la cadena alfa de FSH

<400> 18

aaaggatcct taagatttgt gataataac 29

<210> 19

<211> 30

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para la cadena beta de FSH

ES 2 620 261 T3

<400> 19
 ttaagctta tgaagacact ccagttttc 30
 <210> 20
 <211> 27
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador para la cadena beta de FSH
 <400> 20
 10 ttggatcct tattcttca ttcacc 27
 <210> 21
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia de cDNA
 <220>
 <221> rasgo misc_
 222> (1)..(63)
 20 <223> secuencia líder de TCR
 <400> 21

atggcctgcc ccggcttcct gtggggcctg gtgatcagca cctgcctgga attctccatg 60
 gctaacagct gcgagctgac caacatcacc atcgccatcg agaaagagga atgccggttc 120
 tgcacagca tcaacaccac ctggtgcgcc ggctactgct acacccggga cctggtgtac 180
 aaggaccccg ccaggcccaa gatccagaaa acctgcacct tcaaagaact ggtgtacgag 240
 accgtgcggg tgcccggctg cgcccaccac gccgacagcc tgtacaccta ccccgtggcc 300
 acccagtgcc actgcggcaa gtgcgacagc gacagcaccg actgcaccgt gaggggcctg 360
 ggccccagct actgcagctt cggcgagatg aaagagtga 399

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar una célula huésped para producir una composición de proteína que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

- 5 (i) tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o
- 10 (ii) comprende más que 35% de estructuras G2 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína; y/o
- 15 (iii) tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o
- 20 (iv) comprende menos que 22% de estructuras G0 presentes en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína; y/o
- 25 (v) comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o
- 30 (vi) comprende al menos 2% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora; y/o
- 30 (vii) tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma, en donde

- 35 - tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; o
- 40 - tiene un grado de sialilación disminuido, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC N° CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

mediante las siguientes etapas

- 50 (a) introducir en al menos dos células huésped diferentes que proporcionan un patrón de glicosilación divergente al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma; en donde al menos una de dichas células huésped es una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en las líneas celulares DSM ACC2858 (GT-2X), DSM ACC2806 (NM-H9D8), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de las mismas; y
- 55 (b) cultivar dichas al menos dos células huésped diferentes, en donde cada célula huésped diferente produce una composición de proteína que tiene un patrón de glicosilación divergente del patrón de glicosilación producido por la otra célula huésped;
- 60 (c) aislar dichas composiciones de proteína expresadas que llevan un patrón de glicosilación diferente de las al menos dos células huésped diferentes; y
- 60 (d) seleccionar dicha célula huésped que produce una composición de proteína que tiene al menos una de las características de glicosilación definidas en (i) a (vii).

2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha composición de proteína presenta al menos una de las siguientes características:

- 65 - en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una citotoxicidad celular mediada por

Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

y/o

5 - en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

y/o

10 - tiene un rendimiento medio o máximo aumentado de dicha composición molecular de proteína que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-).

15 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde al menos una de dichas células huésped es capaz de producir una composición de proteína

- que tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

20 - en donde las moléculas de proteína en la composición tienen un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células DSM ACC2606 (NM-F9) o DSM ACC2605 (NM-D4); en donde las células DSM ACC2606 (NM-F9) y DSM ACC2605 (NM-D4) sólo alcanzan aproximadamente 50 a 60% del grado de sialilación que se obtiene con la célula huésped usada en la etapa (a) del método de producción.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde

30 (i) al menos una de dichas células huésped es capaz de producir una composición de proteína, preferiblemente una composición de anticuerpo, que comprende al menos 2%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10% o al menos 15% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora; y/o

35 (ii) al menos una de dichas células huésped es capaz de producir una composición de proteína, preferiblemente una composición de anticuerpo, en donde las moléculas de proteína en la composición tienen un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 20%, preferiblemente al menos 30% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

40 (iii) al menos una de dichas células huésped es capaz de producir una composición de proteína, preferiblemente una composición de anticuerpo, que comprende al menos 50%, preferiblemente al menos 60% y más preferiblemente al menos 70% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína, que carece de fucosa.

50 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos una de dichas células huésped es capaz de producir una composición de proteína, preferiblemente una composición de anticuerpo, que presenta un patrón de glicosilación que tiene las siguientes características:

(i) no comprende NeuGc detectable;

55 (ii) no comprende Gal α 1-3Gal detectable;

(iii) comprende NeuNAc enlazado en alfa2-6;

60 (iv) tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y

65 (v) comprende al menos 2% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además determinar la actividad, afinidad y/o semivida en suero de las proteínas producidas en las diferentes líneas celulares
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en el grupo de citocinas y sus receptores, tales como los factores de necrosis tumoral TNF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotropinas, tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona luteneizante (LH), tirotrófina, y gonadotropina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocina, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrófina-3, neurotrófina-4, neurotrófina-5, neurotrófina-6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), tales como IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadesinas; glicoforina A; MUC1.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
9. El método según la reivindicación 8, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos contra gangliósido GD3, anticuerpos contra cadena alfa del receptor de interleucina-5 humana, anticuerpos contra HER2, anticuerpos contra quimiocina CC receptora 4, anticuerpos contra CD20, anticuerpos contra CD22, anticuerpos contra neuroblastoma, anticuerpos contra MUC1, anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico; en particular un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PankoMab, Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptin, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, OKT3, anticuerpo KM2160 anti-quimiocina CC receptora 4, y anticuerpo chCE7 anti-neuroblastoma.
10. El método según la reivindicación 8, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo contra MUC1; un anticuerpo contra HER2; y un anticuerpo contra EFGR.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha proteína
- (i) está fusionada a otra secuencia de péptido o polipéptido tal como un enlazador, una molécula activadora o una toxina; o
 - (ii) es un fragmento de anticuerpo fusionado a otra secuencia de proteína, en particular una secuencia de proteína seleccionada del grupo que consiste en citocinas, factores co-estimulatorios, toxinas, fragmentos de anticuerpo de otros anticuerpos, secuencias de multimerización, y secuencias para la detección, purificación, secreción o estabilización tales como etiquetas, señales de localización o enlazadores; o
 - (iii) es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo acoplado a una molécula efectora que media un efecto terapéutico, tal como una molécula efectora inmune, una toxina o un radioisótopo.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el anticuerpo es de la clase IgG, preferiblemente un IgG humano, humanizado o quimérico que comprende una región Fc humana.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde la composición de anticuerpo comprende al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo con al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio de la región Fc.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el anticuerpo tiene al menos un sitio de N-glicosilación que tiene la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr, en donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto Pro, y/o al menos un sitio de O-glicosilación en la secuencia de la región Fab.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde la composición de anticuerpo comprende

- 5 (i) una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio de la parte Fc, en donde la composición de anticuerpo tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida, cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas o seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, CHOdhfr-, BHK, NSO, SP2/0, DSM ACC2606 (NM-F9), DSM ACC2605 (NM-D4), PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas; o
- 10 (ii) una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida al menos a un sitio de N-glicosilación y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab de la molécula de anticuerpo, en donde la composición de anticuerpo tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida, cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas o seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, CHOdhfr-, BHK, NSO, SP2/0, DSM ACC2606 (NM-F9), DSM
- 15 ACC2605 (NM-D4), PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas.

16. Un método para producir una composición de proteína, que comprende

- 20 (a) realizar un método para seleccionar una célula huésped para producir una composición de proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y
- (b) cultivar la célula huésped seleccionada en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína; y
- (c) aislar dicha composición de proteína.

25 17. El método según la reivindicación 16, en donde dicha proteína es un anticuerpo.

Fig. 1

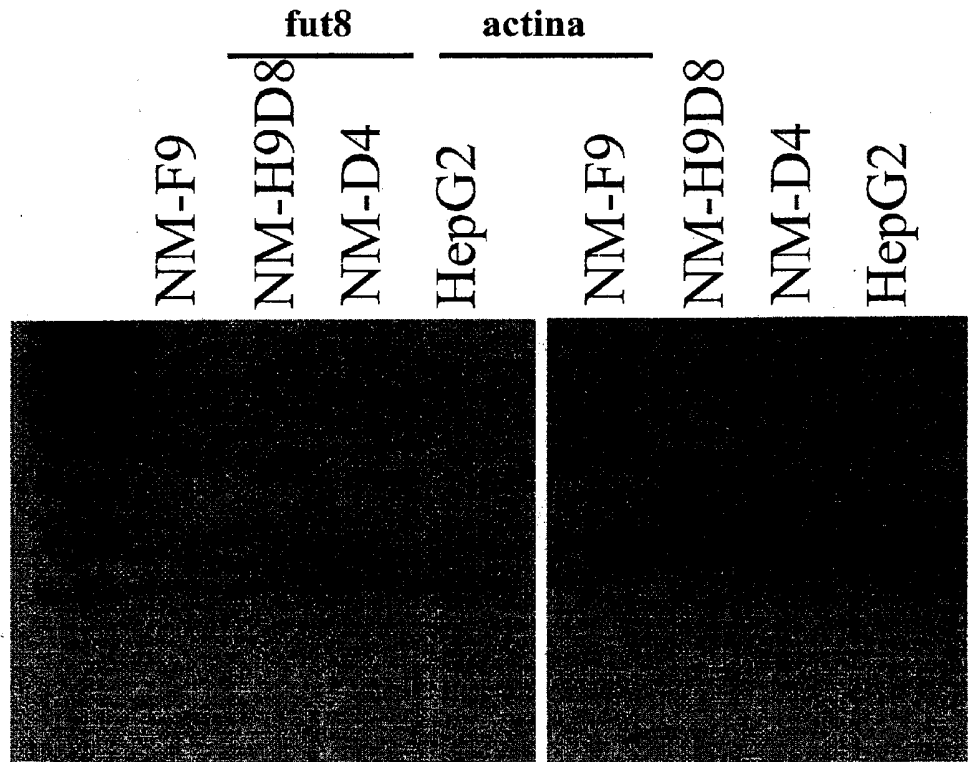


Fig. 2

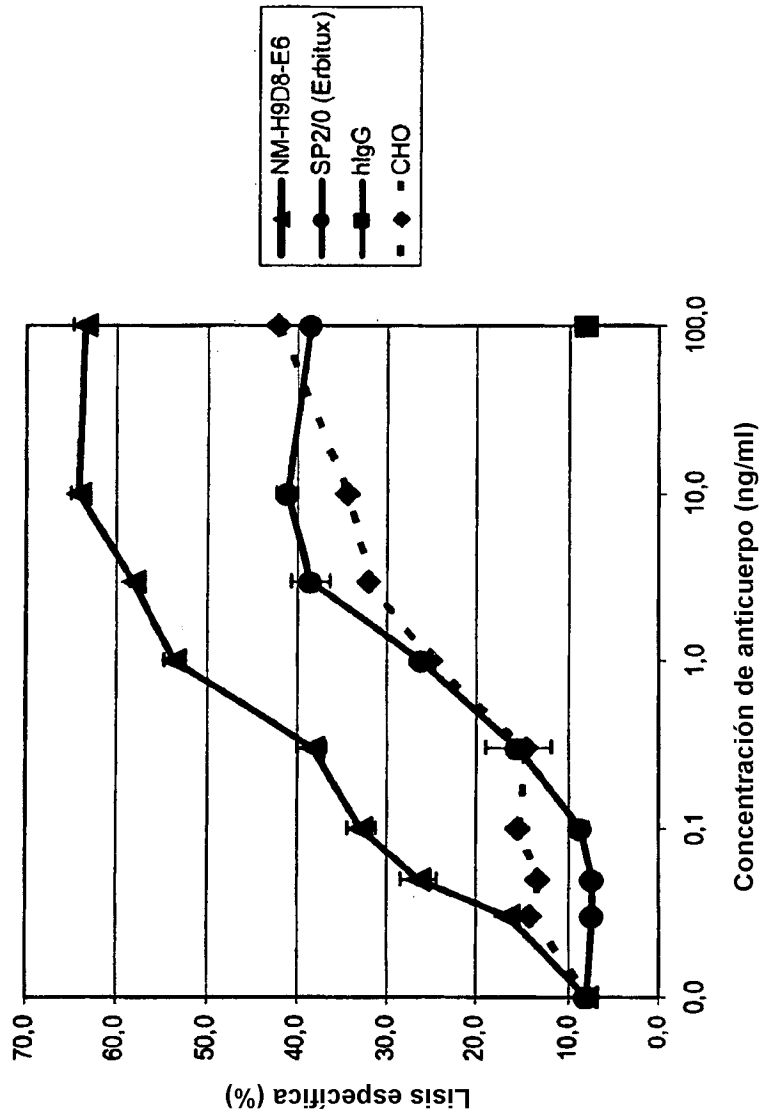
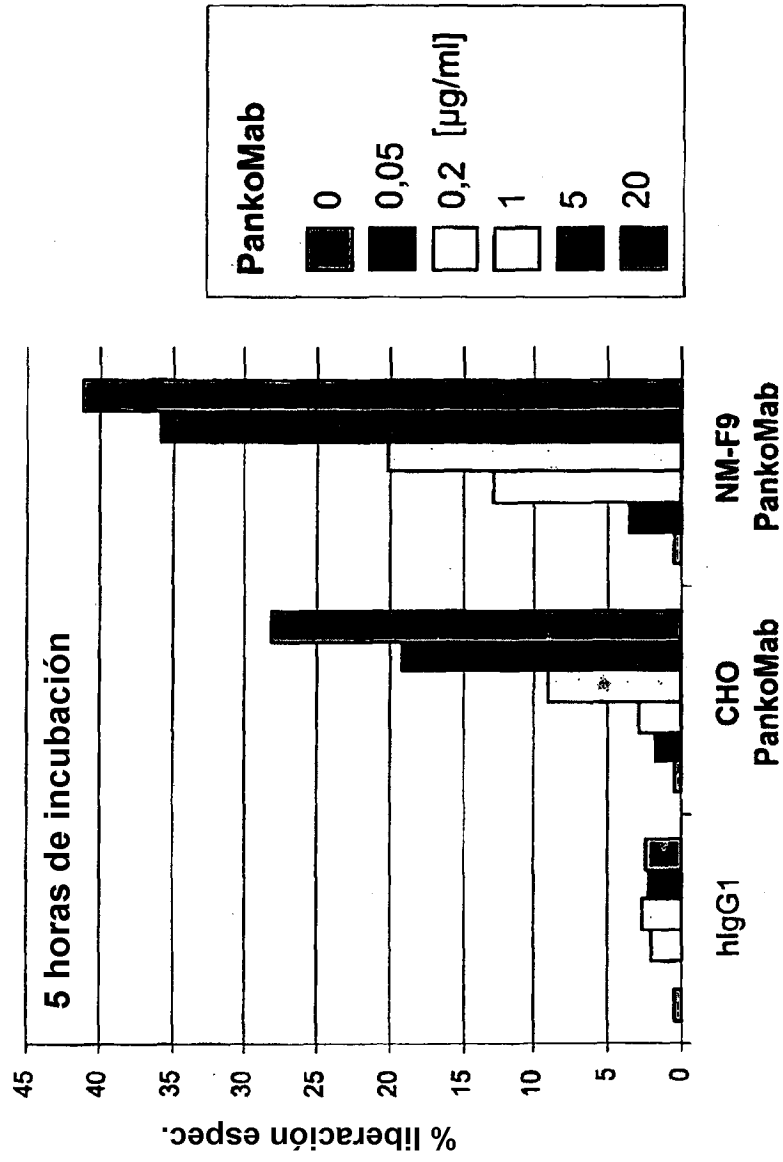


Fig. 3



lisis mediada por ADCC de células tumorales cargadas con Eu^{3+} ; relación célula diana / efectora (ZR75-1 / PBMC) 1:100

Fig. 4

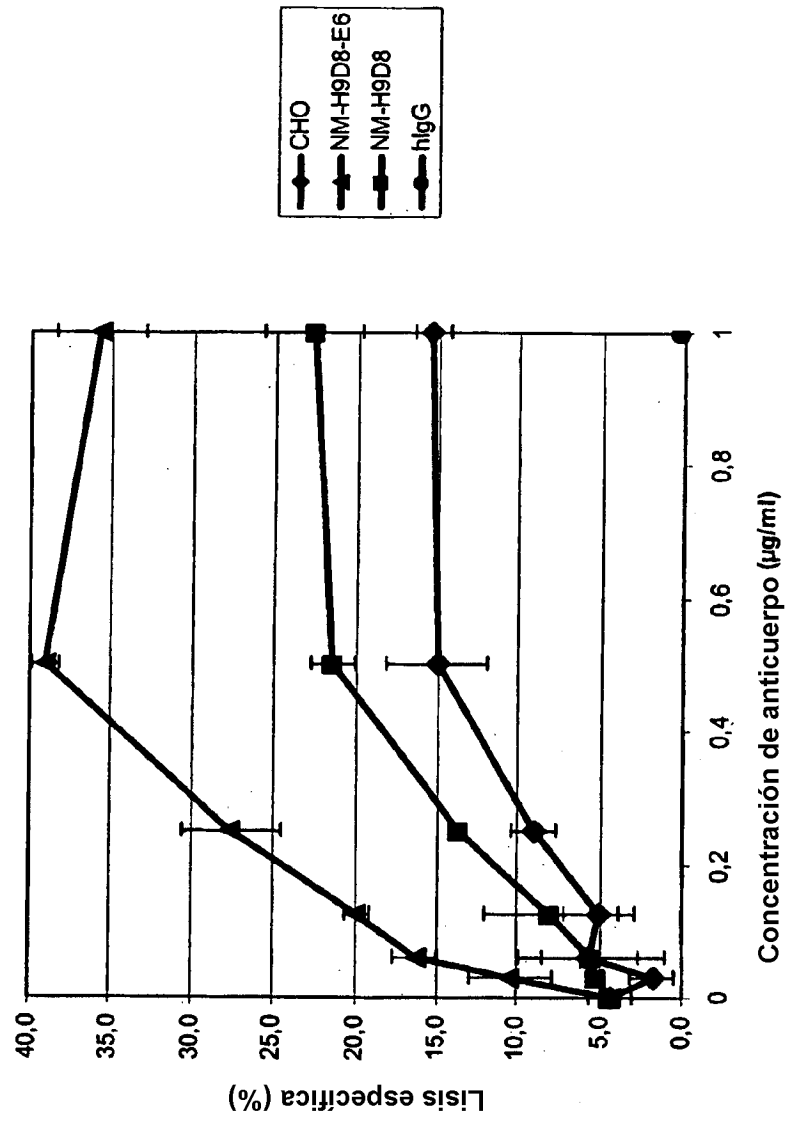


Fig. 5

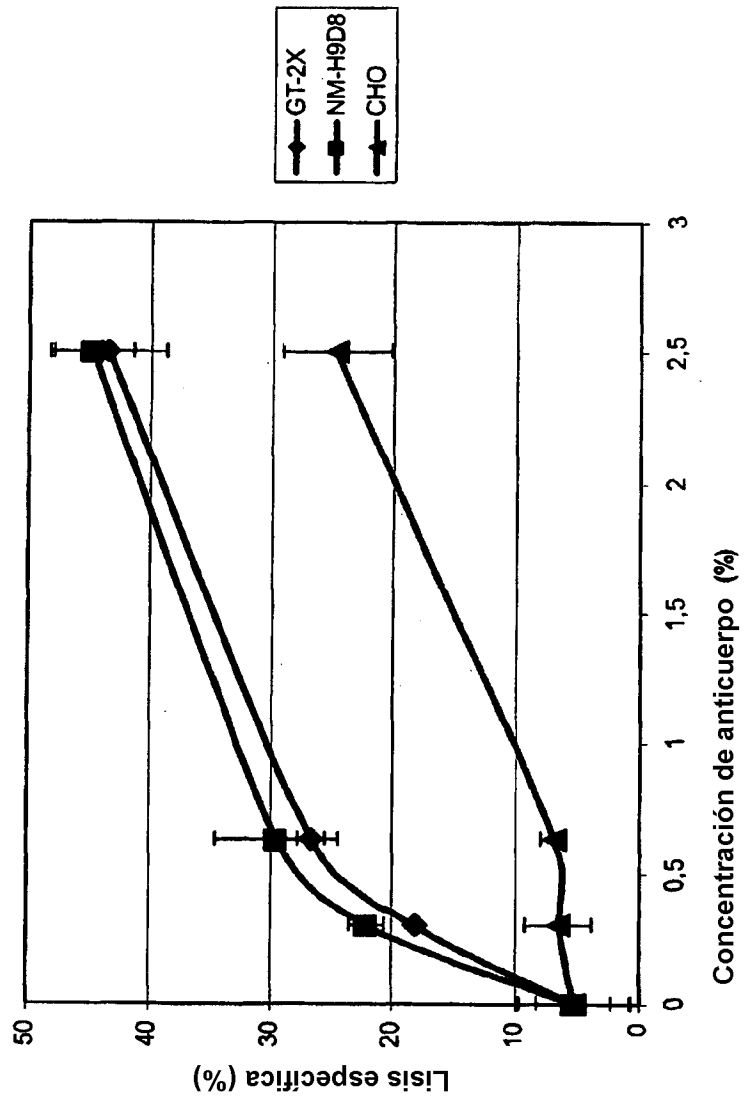


Fig. 6

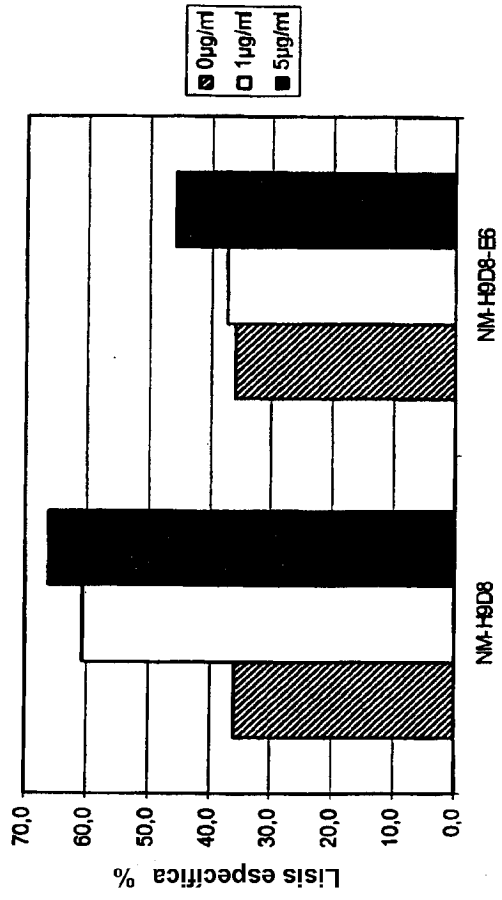


Fig. 7

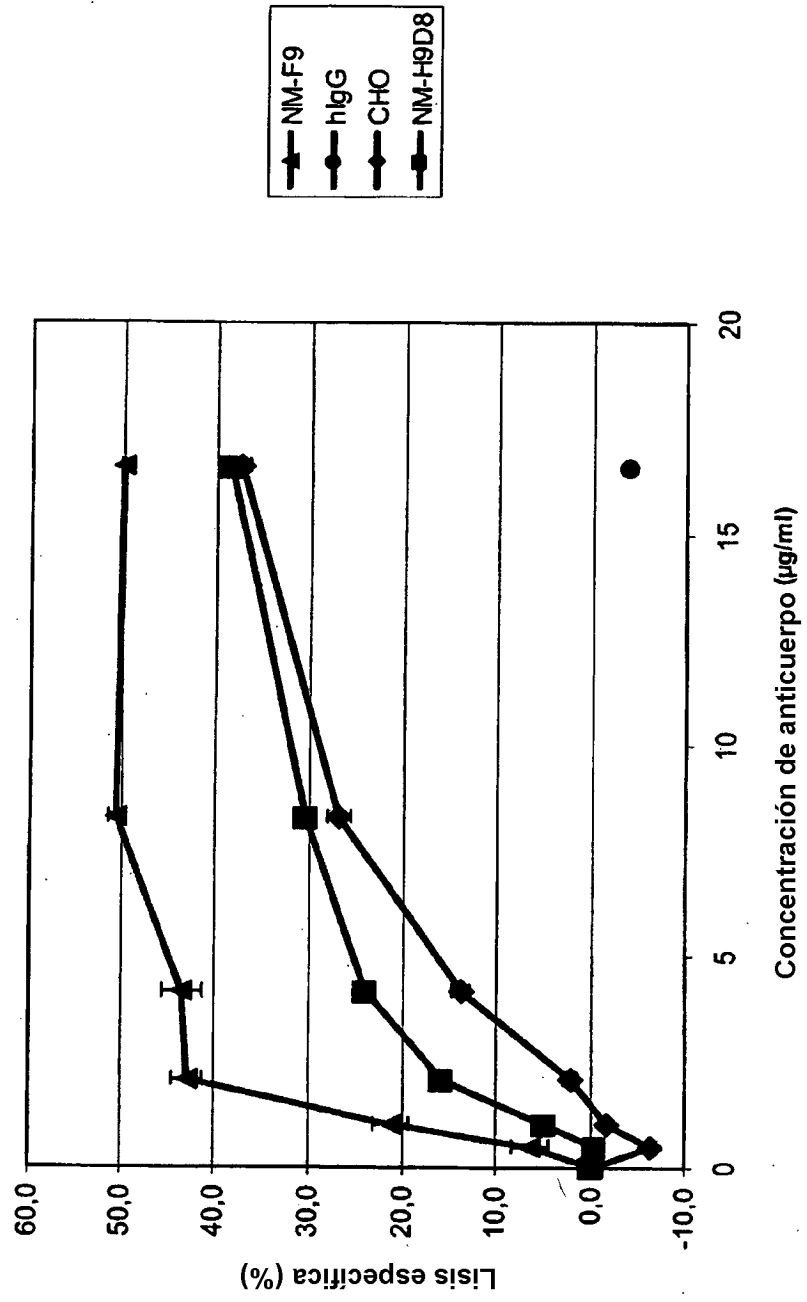


Fig. 8

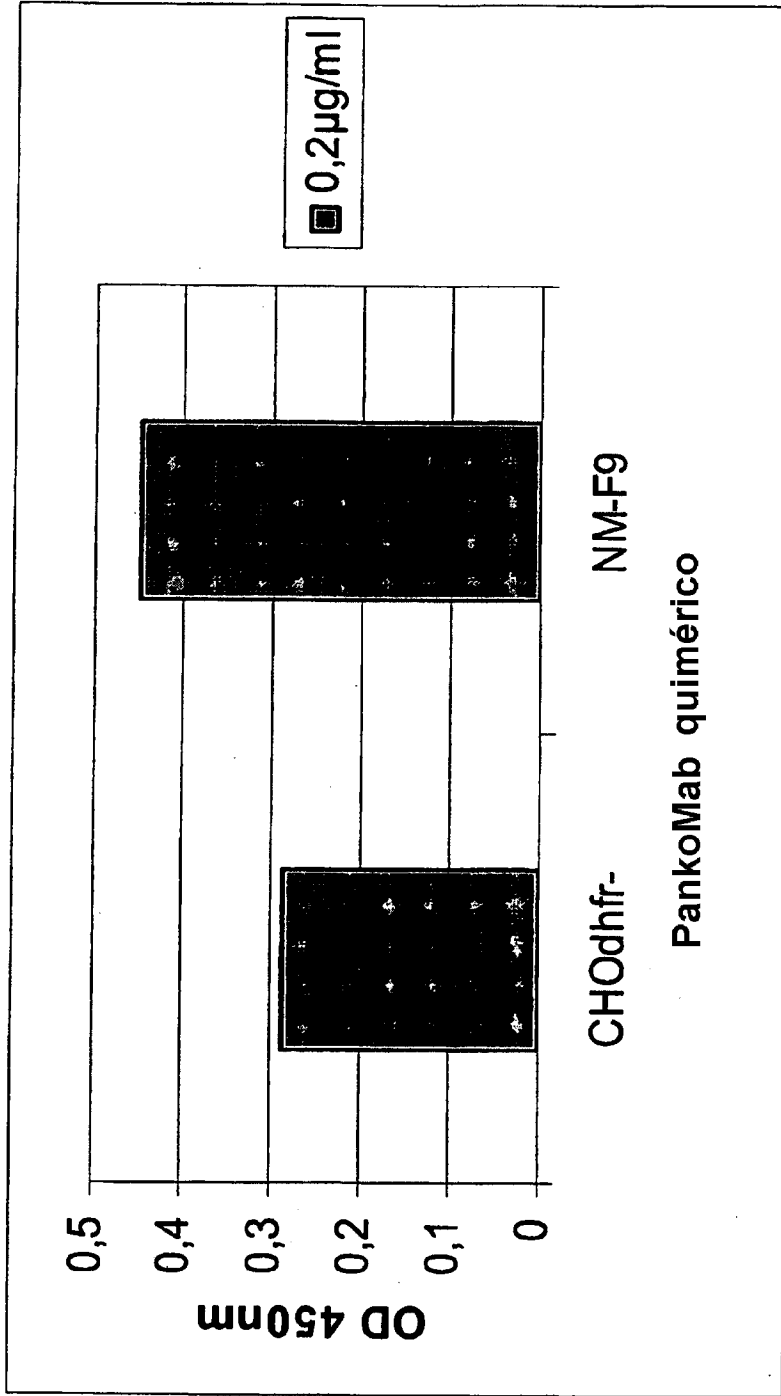


Fig. 9

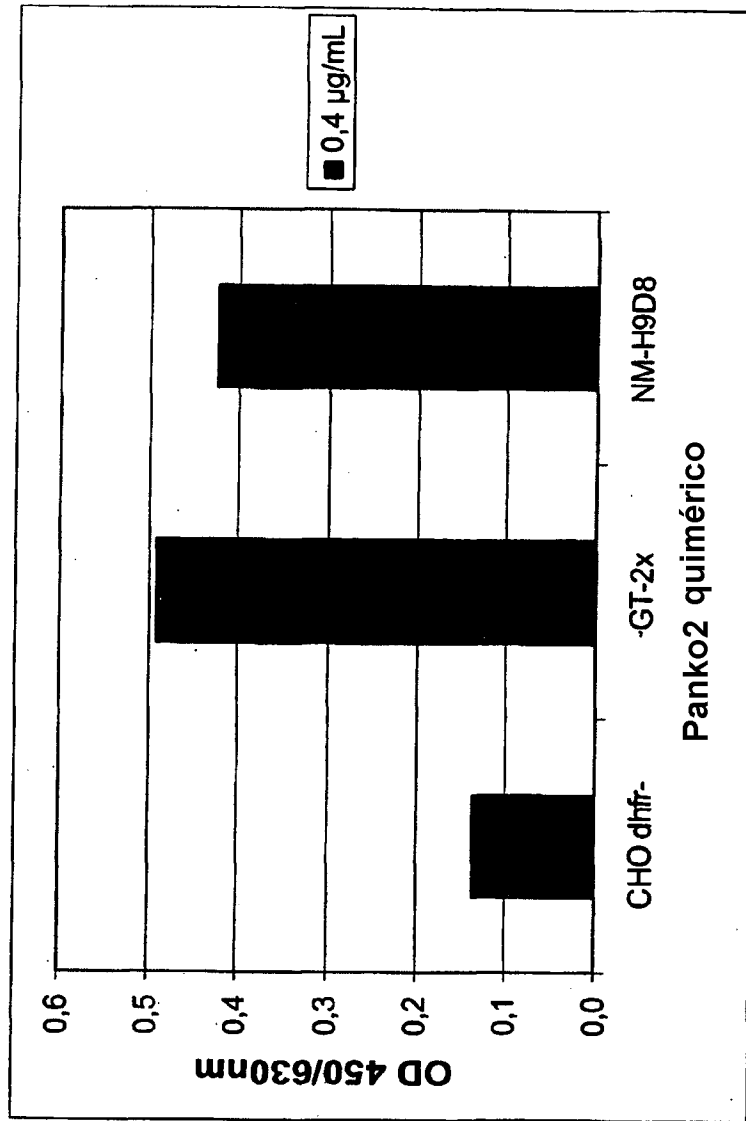


Fig. 10

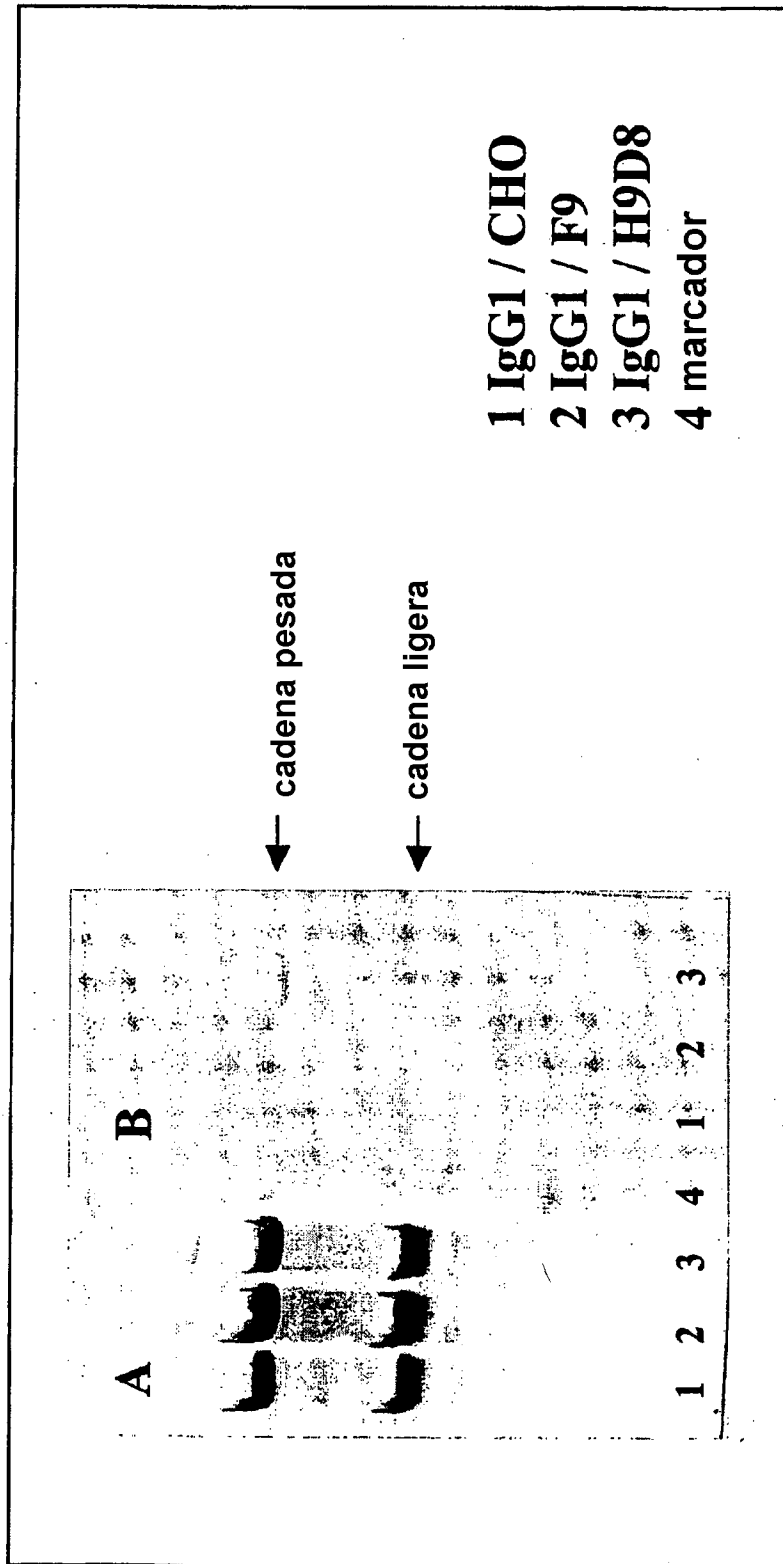


Fig. 11

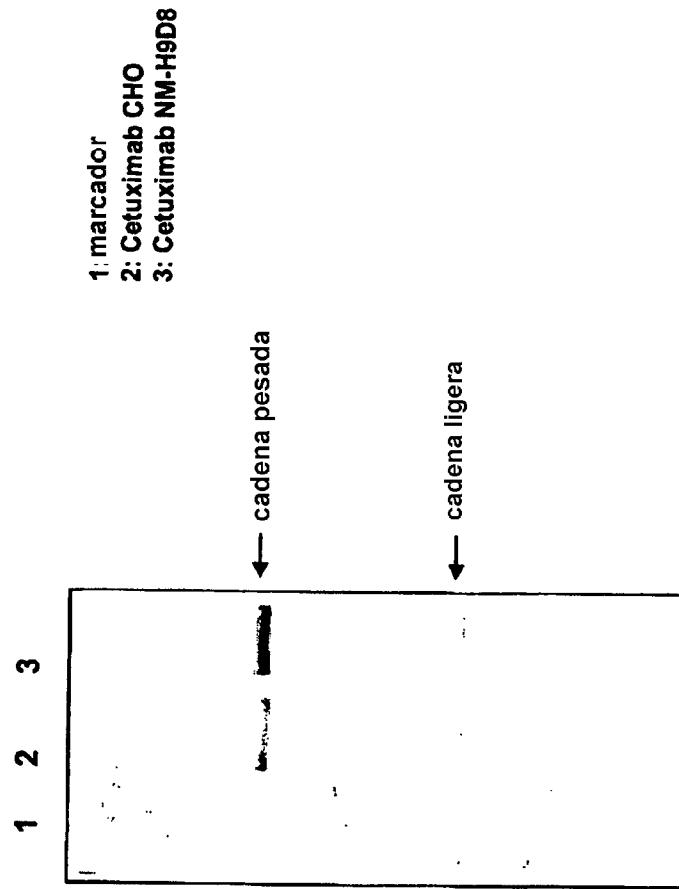


Fig. 12

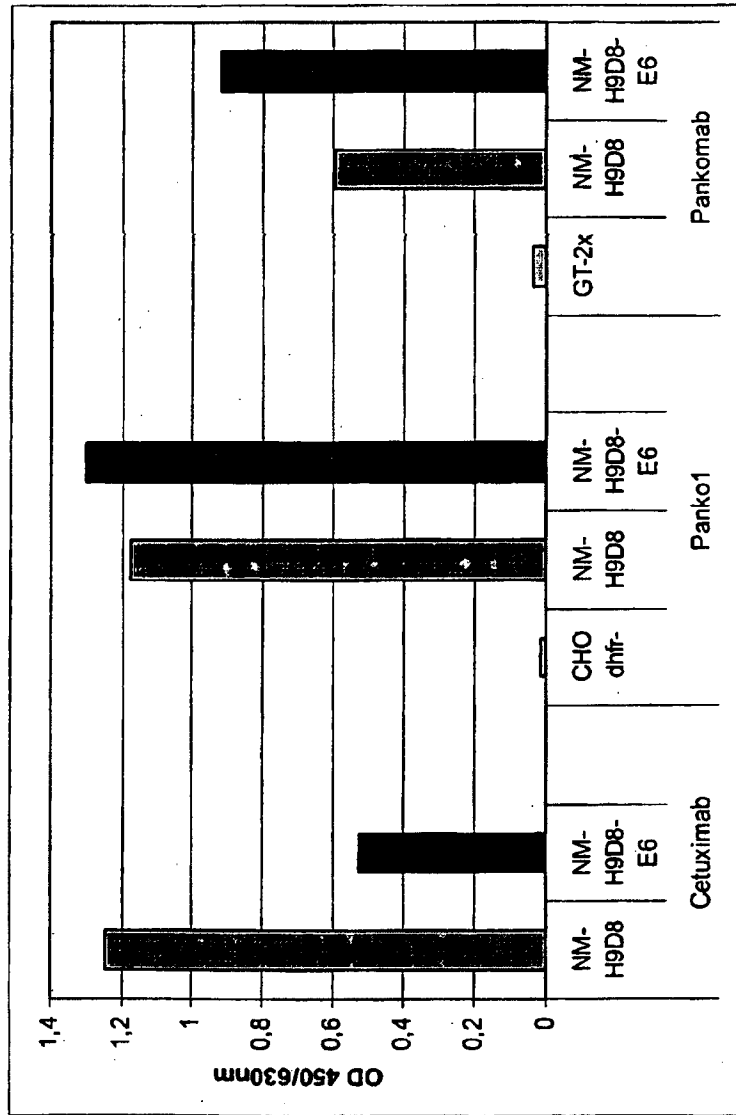


Fig. 13a

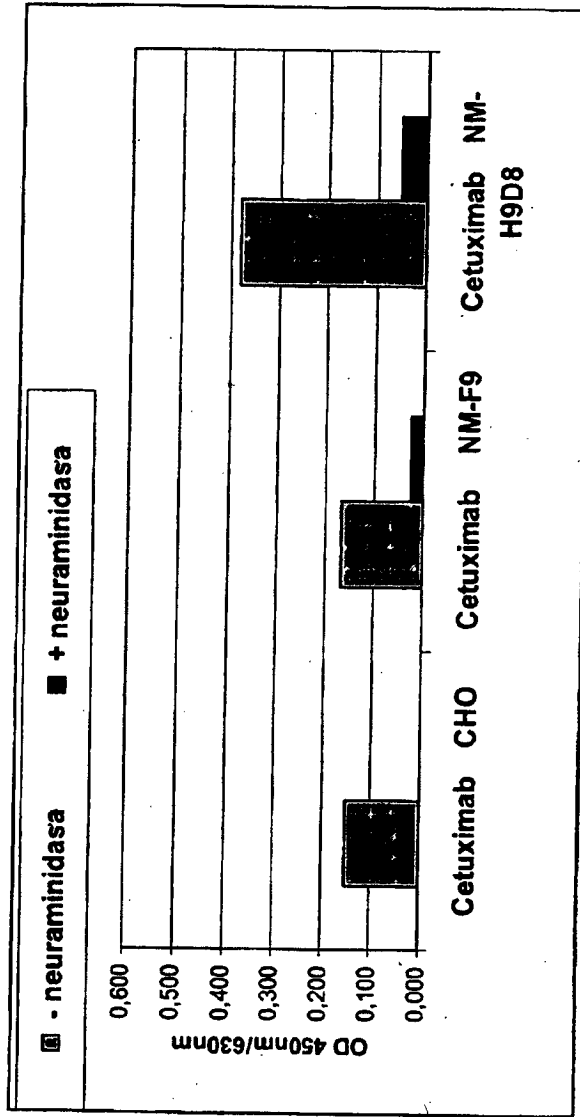


Fig. 13b

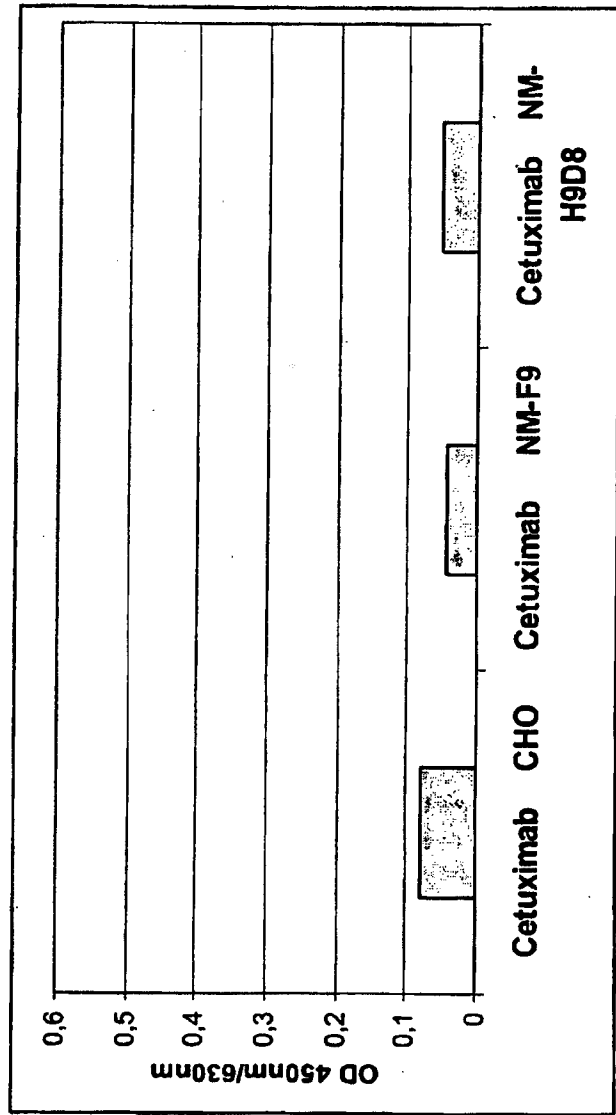


Fig. 14

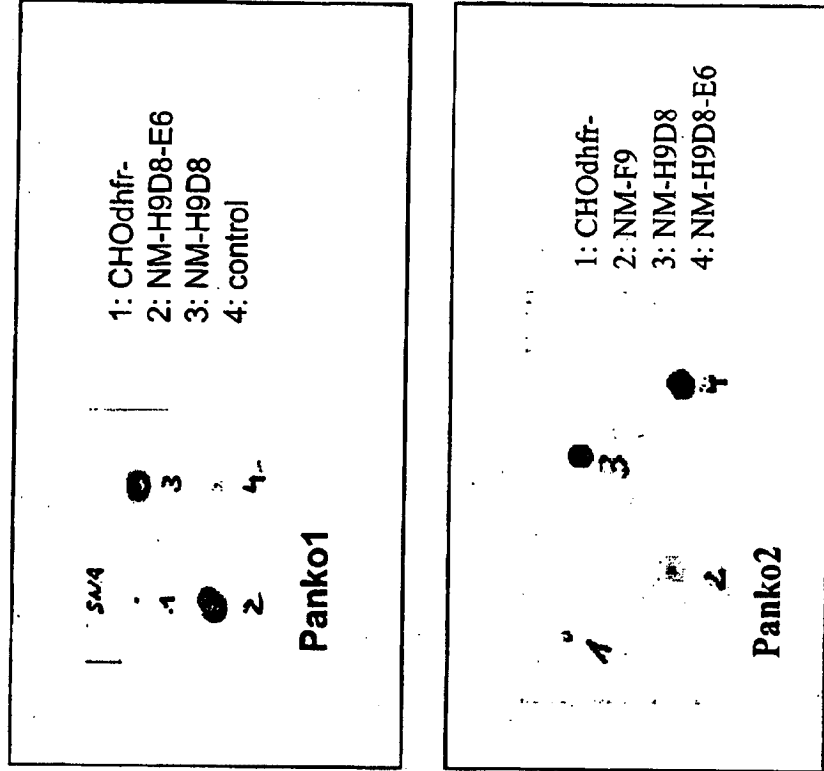


Fig. 15

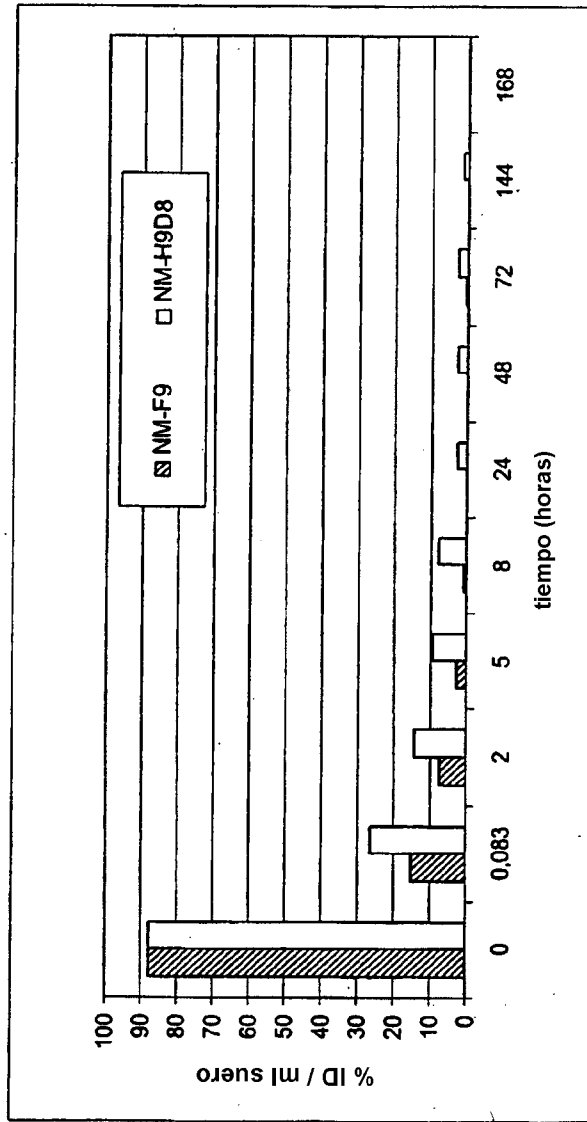


Fig. 16

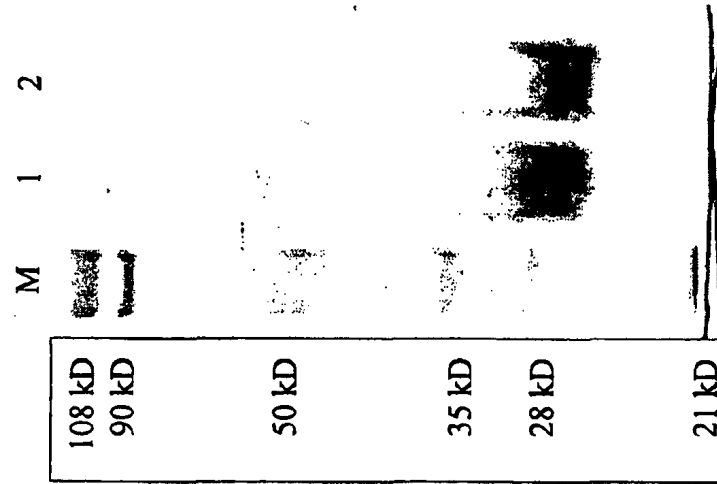


Fig. 17

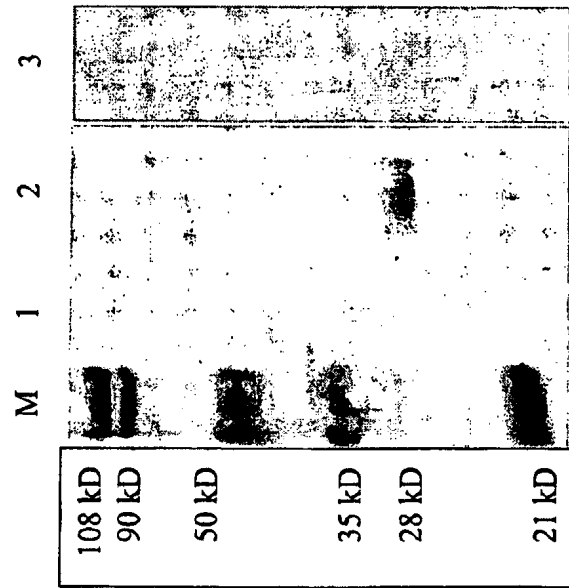
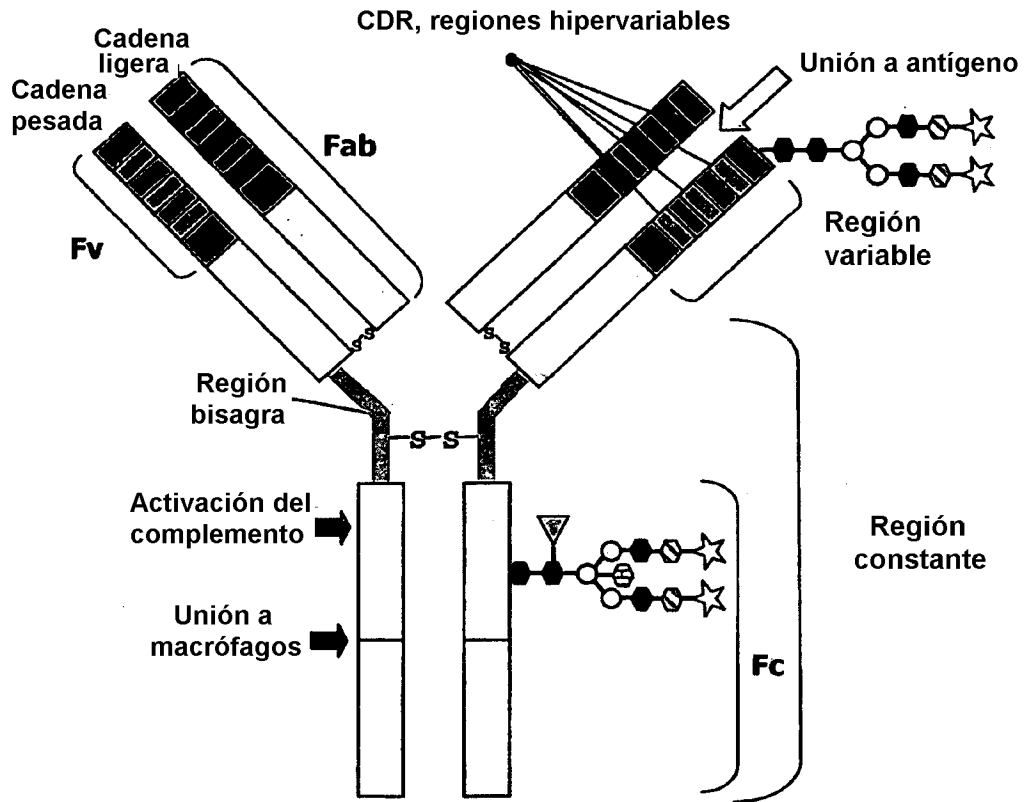


Fig. 18



☆	= ácido siálico
▨	= Galactosa
●	= GlcNAc
○	= Manosa
▽	= Fucosa
⬢	= GlcNAcbisectora