

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 594**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013** **PCT/US2013/062410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014** **WO14055370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013** **E 13776656 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017** **EP 2904092**

54 Título: **Composiciones y métodos para producir glicoproteínas**

30 Prioridad:

01.10.2012 US 201261708554 P

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

14.12.2017

73 Titular/es:

ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

VARMA, AMIT;
CUENCA, JAMES y
ZHU, YING

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 646 594 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

Composiciones y métodos para producir glicoproteínas

5 2. Antecedentes

La modificación post-traducciona de proteínas mediante glicosilación da lugar a la formación de distintas glicoformas, que a menudo tienen propiedades únicas. Las diferencias en la glicosilación de proteínas pueden tener una profunda influencia en las propiedades físicas y químicas de la proteína, incluyendo la afinidad de unión de la proteína por una molécula diana en particular. Se conocen varios métodos de modulación de la glicosilación de proteínas. Los diferentes sistemas de expresión pueden impartir distintos perfiles de glicosilación. Además, las secuencias que codifican proteínas se pueden modificar para producir proteínas con un nivel aumentado o disminuido de una glicoforma particular. Las condiciones en las que se cultivan las líneas celulares recombinantes también pueden tener influencia en el perfil de glicosilación.

Los anticuerpos producidos de manera recombinante en células de mamífero a menudo se glicosilan en las regiones Fc y Fab del anticuerpo. Muchos anticuerpos glicosilados contienen el azúcar fucosa. La presencia de fucosa en un anticuerpo puede tener influencia en la unión del anticuerpo a proteínas particulares sobre las células. Por ejemplo, los anticuerpos que contienen altos niveles de fucosa en la región Fc del anticuerpo pueden tener una unión disminuida a los receptores sobre los linfocitos (por ejemplo, los linfocitos citotóxicos naturales). Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con una actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) aumentada, especialmente a bajas dosis de anticuerpo. Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466. Los métodos para preparar anticuerpos con menos fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan bajos niveles de ARNm FUT8, que codifica una enzima (α 1,6-fucosiltransferasa) necesaria para la fucosilación de proteínas. Los métodos alternativos para aumentar la actividad ADCC incluyen las mutaciones en la parte Fc de un anticuerpo, particularmente las mutaciones que aumentan la afinidad del anticuerpo por el receptor Fc γ R. Se ha demostrado una correlación entre el aumento de la unión a Fc γ R con el Fc mutado utilizando ensayos basados en toxicidad celular dirigida. Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Presta et al., 2002, Biochem Soc. Trans. 30:487-490.

La concentración de componentes en un medio de cultivo o medio continuo puede tener influencia en el perfil de glicosilación de una proteína. Idealmente, se puede aumentar o disminuir una glicoforma particular de una proteína mediante el control de las condiciones en las que se cultivan las líneas celulares recombinantes. Aunque ha habido una multitud de estudios dirigidos al aumento de los rendimientos de proteínas mediante la manipulación de los componentes de un medio de cultivo, ha habido muy pocos informes relativos a la modulación de la glicosilación de las proteínas mediante la modificación del medio de cultivo celular en el que se cultivan las células modificadas de manera recombinante. Un ejemplo se desvela en la Patente de EE. UU. Nº 5.705.364, que se refiere a procesos para controlar el contenido de ácido siálico de glicoproteínas producidas por células de mamífero mediante la adición de un ácido alcanoico al medio de cultivo. Sin embargo, no se ha hecho frente a la posibilidad de aumentar la actividad ADCC de los anticuerpos mediante modificaciones en el medio de cultivo en el que se expresan los anticuerpos recombinantes suficientemente. En consecuencia, sería altamente deseable desarrollar un medio de cultivo para cultivar células de mamífero que exprese anticuerpos con niveles reducidos de fucosa y actividad ADCC aumentada.

El documento WO 02/066603 desvela métodos y composiciones de medios definidos químicamente para el cultivo de células de mamífero para la producción de cantidades comercialmente útiles de proteínas expresadas.

3. Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere al descubrimiento de que las glicoproteínas (por ejemplo, los anticuerpos) con propiedades beneficiosas se producen cultivando células de mamífero en un medio de cultivo que comprende una alta concentración (por ejemplo, al menos de 5 mM) de glicina (de aquí en adelante "medio alto en glicina"). En particular, cultivando células huésped de mamífero en medio alto en glicina aumenta los niveles de glicoformas no fucosiladas. Las células de mamífero se pueden utilizar para producir anticuerpos que presentan un aumento de la actividad biológica, incluyendo la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC").

En consecuencia, la divulgación proporciona en general métodos y composiciones para expresar proteína recombinantes (por ejemplo, anticuerpos) con perfiles de glicosilación modificados en comparación con las glicoproteínas que se expresan en medios de cultivo tradicionales. Los métodos y composiciones utilizan un medio alto en glicina para expresar glicoproteínas, tales como anticuerpos, en células de mamífero, da como resultado ventajosamente glicoproteínas con niveles de fucosilación reducidos en comparación con las glicoproteínas producidas en medios de cultivo tradicionales.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de producción de un anticuerpo IgG1, que comprende el cultivo de células NS0 modificadas para secretar y expresar el anticuerpo IgG1 en un medio de cultivo celular que comprende glicina a una concentración entre 5 mM y 30 mM en condiciones adecuadas para la expresión y secreción del anticuerpo IgG1, produciendo de esta manera el anticuerpo IgG1.

Adicionalmente, los métodos de la divulgación se pueden utilizar para modular y controlar la glicosilación proteica durante la fabricación. El control mejorado de la glicosilación del producto durante la fabricación ya que reducirá el riesgo de rechazo de lotes y mejora el control durante la tecnología de transferencia entre los sitios de fabricación y durante el aumento de escala del procedimiento. Por lo tanto, los métodos que se pueden utilizar para mantener perfiles reproducibles de la glicosilación del producto sin introducir cambios de procedimiento.

Las células de mamífero capaces de modificarse para producir glicoproteínas recombinantes incluyen células NS0, células CHO, células SP2/0 de mieloma de ratón, células de riñón de hámster recién nacido BHK-21, y células de riñón embrionario humanas HEK0291. En realizaciones particulares, las células NS0 se modifican de manera recombinante para producir anticuerpos.

En un aspecto, la divulgación proporciona un medio de cultivo adecuado para el cultivo de células de mamífero que comprende glicina a una concentración de entre 5 mM y 100 mM y opcionalmente otros aminoácidos a distintas concentraciones como se indica en la divulgación. El medio de cultivo preferentemente es un medio libre de proteínas definido químicamente. La concentración de glicina en el medio de cultivo celular puede ser, por ejemplo, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM, 30 mM o 50 mM. En ciertas realizaciones, la concentración de glicina en el medio de cultivo celular se une a cualquiera de las dos realizaciones anteriores, por ejemplo, una concentración que varía desde 5 mM a 10 mM, desde 7 mM a 10 mM, desde 10 mM a 15 mM, desde 12 mM a 17 mM, desde 15 mM a 20 mM, desde 16 mM a 18 mM desde 10 mM a 30 mM, desde 10 mM a 25 mM, desde 20 mM a 30 mM, desde 10 mM a 50 mM, desde 20 mM a 50 mM, etc. Pueden estar presentes otros aminoácidos en el medio de cultivo, en general a concentraciones que se encuentran normalmente en un medio básico tradicional. En una realización, las concentraciones de los aminoácidos en el medio de cultivo de la presente divulgación se encuentran en los intervalos enumerados en la Tabla 2. El medio de cultivo también puede incluir uno o más componentes adicionales tales como vitaminas, elementos traza, fuentes de energía, ácidos grasos, factores de crecimiento, nucleótidos, lípidos, hormonas y/o antibióticos. Además, el medio puede incluir un tampón, un regulador de la osmolalidad y/o un tensioactivo. Los detalles adicionales de dichos componentes adicionales se pueden encontrar en la Sección 5.1.

En otro aspecto, uno o más aminoácidos distintos de la glicina tienen concentraciones de o por debajo de las concentraciones que se muestran en la Tabla 3 o la Tabla 4. Por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once aminoácidos pueden tener concentraciones de o debajo de las concentraciones enumeradas en la Tabla 3 o la Tabla 4. En una realización, la concentración de lisina en el medio de cultivo está entre 0,5 mM y 5,0 mM.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir una glicoproteína de interés ("GOI"), por ejemplo, un anticuerpo de interés ("AOI"), que comprende el cultivo de células de mamífero, por ejemplo células NS0, modificadas para secretar y expresar el GOI o AOI en un medio de cultivo celular que comprende glicina a una concentración de al menos 5 mM, por ejemplo, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM o 30 mM. El AOI puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo completamente humano. En realizaciones específicas, la concentración de glicina en el medio de cultivo celular se une a cualquiera de las dos realizaciones anteriores, por ejemplo, una concentración de glicina varía desde 5 mM a 10 mM, desde 7 mM a 10 mM, desde 10 mM a 15 mM, desde 12 mM a 17 mM, desde 15 mM a 20 mM, desde 16 mM a 18 mM, desde 10 mM a 30 mM, desde 10 mM a 25 mM, desde 20 mM a 30 mM, etc. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo es un medio libre de proteínas definido químicamente.

En una realización, el AOI es HuLuc63 (elotuzumab). La secuencia de aminoácidos de la cadena VH madura de elotuzumab (SEQ ID NO: 1), la cadena VL madura de elotuzumab (SEQ ID NO: 2), la secuencia completa de cadena pesada de elotuzumab (SEQ ID NO: 3) y la secuencia completa de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) se muestran en la Tabla 7. Los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de elotuzumab en la que al menos un 4% de los glucanos carecen de fucosa y en el que al menos un 2,5% de los glucanos son glucanos 5 manosas. En una realización, los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de elotuzumab en la que al menos un 5% de los glucanos carece de fucosa y en la que al menos un 3% de los glucanos son glucanos 5 manosas.

En otra realización, el anticuerpo de interés es daclizumab. La secuencia de aminoácidos de la cadena VH madura de daclizumab (SEQ ID NO: 5), la cadena VL madura de daclizumab (SEQ ID NO: 6), la secuencia completa de cadena pesada de daclizumab (SEQ ID NO: 7) y la secuencia completa de cadena ligera (SEQ ID NO: 8) se muestran en la Tabla 7. Los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de daclizumab en la que al menos un 3% de los glucanos carecen de fucosa y en el que al menos un 1,5% de los glucanos son glicoformas 5 manosas. En una realización, los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de daclizumab en la que al menos un 4% de los glucanos carece de fucosa y en la que al menos un 2% de los glucanos son glucanos 5 manosas.

En otra realización, el AOI es voloxicimab. La secuencia de aminoácidos de la cadena VH madura de voloxicimab (SEQ ID NO: 9), la cadena VL madura de voloxicimab (SEQ ID NO: 10), la secuencia completa de cadena pesada

de voloxicismab (SEQ ID NO: 11) y la secuencia completa de cadena ligera (SEQ ID NO: 12) se muestran en la Tabla 7. Los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de voloxicismab en la que al menos un 1% de los glucanos carecen de fucosa y en el que al menos un 0,5% de los glucanos son glucanos 5 manosas.

En una realización adicional, el AOI es PDL241. La secuencia de aminoácidos de la cadena VH madura de PDL241 (SEQ ID NO: 13), la cadena VL madura de PDL241 (SEQ ID NO: 14), la secuencia completa de cadena pesada de PDL241 (SEQ ID NO: 15) y la secuencia completa de cadena ligera (SEQ ID NO: 16) se muestran en la Tabla 7. Los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de PDL241 en la que al menos un 14% de los glucanos carecen de fucosa y en el que al menos un 8% de los glucanos son glucanos 5 manosas. En una realización, los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de PDL241 en la que al menos un 15% de los glucanos carece de fucosa y en la que al menos un 9% de los glucanos son glucanos 5 manosas.

En otra realización más, el AOI es PDL192 (enavatuzumab). La secuencia de aminoácidos de la cadena VH madura de enavatuzumab (SEQ ID NO: 17), la cadena VL madura de enavatuzumab (SEQ ID NO: 18), la secuencia completa de cadena pesada de enavatuzumab (SEQ ID NO: 19) y la secuencia completa de cadena ligera (SEQ ID NO: 20) se muestran en la Tabla 7. Los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de enavatuzumab en la que al menos un 5% de los glucanos carecen de fucosa y en el que al menos un 2,5% de los glucanos son glucanos 5 manosas. En una realización, los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación producen una población de moléculas de enavatuzumab en la que al menos un 6% de los glucanos carece de fucosa y en la que al menos un 3% de los glucanos son glucanos 5 manosas.

4. Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** muestra la estructura de algunos glucanos unidos a N.

La **FIGURA 2** muestra la cantidad relativa de glucanos G0 no fucosilados sin GlcNAc (N-acetilglucosamina) unidos en cinco anticuerpos diferentes producidos por las células NS0 cultivadas en un medio básico suplementado como glicina adicional. La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a la cantidad de glucanos presentes en los anticuerpos producidos por las células NS0 cultivados en un medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

La **FIGURA 3** muestra la cantidad relativa de glucanos 5 manosas (5Man) unidos en cinco anticuerpos diferentes producidos por células NS0 en medio básico con una concentración de glicina de 17 mM. La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a la cantidad de glucanos presentes en los anticuerpos producidos por las células NS0 cultivadas en un medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

La **FIGURA 4** muestra la cantidad relativa de glucanos no fucosilados unidos en cinco anticuerpos diferentes producidos por células NS0 cultivadas en medio básico con una concentración de glicina de 17 mM. La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a la cantidad de glucanos presentes en los anticuerpos producidos por las células NS0 cultivadas en el medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

La **FIGURA 5** muestra las cantidades relativas de la glicoforma G0 no fucosilada sin GlcNAc (N-acetilglucosamina) y glicoformas tipo 5Man unidas en PDL192 producidos por células NS0 cultivadas en un medio básico suplementando con diferentes concentraciones de glicina (5, 15, 30 mM). La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a la cantidad de la glicoforma presente en anticuerpos producidos por células NS0 cultivadas en un medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

La **FIGURA 6** muestra la potencia de unión relativa al receptor CD16a para cuatro anticuerpos IgG1 (elotuzumab, daclizumab, PDL192 y PDL241) producidos por células NS0 cultivadas en un medio básico suplementado con glicina adicional. La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a las afinidades de unión al CD16a de los mismos anticuerpos producidos por las células NS0 cultivadas en un medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

La **FIGURA 7** muestra la potencia de unión relativa al receptor CD16a para el PDL192 (enavatuzumab) producido por las células NS0 cultivadas en el medio básico suplementado con diferentes concentraciones de glicina (5, 15, 30 mM). La cantidad se expresa como un porcentaje relativo a las afinidades de unión a CD16a de los mismos anticuerpos producidos por células NS0 cultivadas en un medio básico de control sin suplementación adicional de glicina.

Las **FIGURAS 8A-C** muestra la actividad ADCC del elotuzumab producido en los procedimientos de control y alto en glicina. Los estudios se llevaron a cabo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas de tres donantes diferentes. Se incluyeron controles negativos en los ensayos utilizando un anticuerpo de control sin actividad ADCC y muestras sin adición de anticuerpos.

Las **FIGURAS 9A-B** muestran la actividad ADCC de PDL241 producido en los procedimientos de control y alto en glicina. Los estudios se llevaron a cabo en PBMC a partir de dos donantes diferentes. Se incluyeron controles negativos en los ensayos utilizando un anticuerpo de control sin actividad ADCC y muestras sin adición de anticuerpos.

Las **FIGURAS 10A-B** muestran la actividad ADCC de PDL192 (enavatuzumab) producido en los procedimientos de control y alto en glicina. Los estudios se llevaron a cabo en PBMC a partir de dos donantes diferentes. Se incluyeron controles negativos en los ensayos utilizando un anticuerpo de control sin actividad ADCC y muestras sin adición de anticuerpos.

Las **FIGURAS 11A-B** muestran la actividad ADCC del daclizumab producido en los procedimientos de control y alto en glicina. Los estudios se llevaron a cabo en PBMC a partir de dos donantes diferentes. Se incluyeron controles negativos en los ensayos utilizando un anticuerpo de control sin actividad ADCC y muestras sin adición de anticuerpos.

5. Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para la expresión de glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos) recombinantes. Las composiciones y métodos producen glicoproteínas con glicofomas fucosiladas reducidas y actividad ADCC aumentada en comparación con la glicoproteína producida en un medio de cultivo tradicional. Los anticuerpos producidos por los sistemas de expresión que utilizan las composiciones y métodos de la divulgación presentan ventajosamente menos fucosilación que cuando se producen por el cultivo en medios tradicionales. Se describen posteriormente distintos aspectos de la divulgación. La sección 5.1 describe los medios de cultivo que contienen concentraciones elevadas (es decir medios altos en glicina) que son adecuadas para el cultivo de células de mamífero capaces de expresar proteínas. La sección 5.2 describe distintas glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos) que se pueden producir en medios altos en glicina. La sección 5.3 describe ácidos nucleicos y sistemas de expresión para producir glicoproteínas. La sección 5.4 describe los métodos de cultivo que se pueden utilizar para producir glicoproteínas. La sección 5.5 describe métodos de recuperación y purificación de glicoproteínas producidas por los métodos de la divulgación. La sección 5.6 describe las poblaciones de glicoproteínas producidas por los métodos de la divulgación. La sección 5.7 describe composiciones farmacéuticas de glicoproteínas producidas por los métodos de la divulgación. La sección 5.8 describe métodos de tratamiento de distintas enfermedades utilizando los anticuerpos ejemplares producidos por los métodos de la presente divulgación.

5.1 Medios de cultivo celular

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un medio de cultivo adecuado para el cultivo de células de mamíferos que comprende altas concentraciones de glicina. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se refiere a un medio adecuado para el crecimiento de células de mamífero en un cultivo celular *in vitro*. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cultivo celular" o "cultivo" se refiere al crecimiento de células de mamífero en un ambiente *in vitro*. Un medio de cultivo típico contiene aminoácidos, vitaminas, elementos traza, ácidos grasos libres, y una fuente de energía. Los componentes de cultivo adicionales tales como factores de crecimiento, nucleósidos, lípidos, hormonas y antibióticos se pueden incluir en el medio de cultivo. Además, el medio puede incluir un tampón, un regulador de osmolalidad y un tensioactivo.

Como será reconocido por el experto, el cultivo y medio nutritivo que se utiliza para cultivar células para la producción de proteínas (por ejemplo, anticuerpos) recombinantes, así como otras variables tales como el calendario de alimentación, velocidad de crecimiento, temperatura y niveles de oxígeno, pueden afectar al rendimiento y calidad de la proteína expresada. Los métodos de optimización de estas condiciones están en el ámbito de un experto; las condiciones ejemplares se exponen en las Realizaciones Ejemplares de la divulgación. Preferentemente, las células se adaptan al crecimiento en medios libres de componentes libres de colesterol, suero y otras fuentes animales; en dichos casos el medio de cultivo y nutritivo incluye preferentemente productos químicos definidos que sustituyen dichos componentes. En consecuencia, los métodos de producción de proteínas recombinantes pueden comprender el cultivo de células de mamífero recombinantes de la presente divulgación en un medio definido químicamente, libre de componentes derivados de animales.

Los medios de cultivo de la divulgación son medios altos en glicina. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio alto en glicina" se refiere a un medio en el que la concentración de glicina es mayor que la concentración de glicina que se encuentra en medios de cultivo típicos. Como se muestra en la Tabla 1 posterior, las concentraciones de glicina en los medios de cultivo comerciales (por ejemplo, medios básicos) varían desde aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM.

Tabla 1: Concentración de glicina en medios de cultivo comerciales típicos

TABLA 1	
Medio	Concentración de Glicina (mM)
DMEM	0,4
DMEM/F12	0,25
IMDM	0,4
MEM, F12 de Ham	0,1
Medium 199	0,67
Medium suplementado con hidrolizado a 5 g/l (asumiendo un 3% glicina)	2,0

La concentración de glicina en el medio de cultivo de la divulgación es preferentemente de 5 mM o mayor. Por ejemplo, la concentración de glicina en el medio de cultivo puede ser desde 5 mM a 100 mM (por ejemplo, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM, 30 mM o 50 mM). En realizaciones específicas, la concentración de glicina en el medio de cultivo se puede encontrar entre cualquiera de los dos valores anteriores, tal como, pero sin limitarse a, una concentración que varía desde 5 mM a 10 mM, desde 7 mM a 10 mM, desde 10 mM a 15 mM, desde 12 mM a 17 mM, desde 15 mM a 20 mM, desde 16 mM a 18 mM, desde 10 mM a 30 mM, desde 10 mM a 25 mM, desde 20 mM a 30 mM, desde 10 mM a 50 mM o desde 20 mM a 50 mM.

Los medios de cultivo de la presente divulgación pueden contener una variedad de aminoácidos además de glicina. Por ejemplo, los medios de cultivo pueden contener otros aminoácidos que incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En realizaciones particulares, el medio de cultivo puede contener aminoácidos (distintos a la glicina) presentes en concentraciones que se encuentran normalmente en los medios tradicionales (por ejemplo, medios básicos). Los aminoácidos adecuados tienen concentraciones en los intervalos enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2: Intervalos de concentración ejemplares de aminoácidos en los medios de cultivo de la presente divulgación

TABLA 2	
Aminoácido	Concentración of aminoácidos en el medio (mM)
Alanina	0,01-0,07
Arginina	0,6-1,6
Asparagina	0,08-1,5
Ácido Aspártico	0,03-0,4
Cisteína	0,1-0,9
Ácido Glutámico	0,03-0,1
Glutamina	2-12
Glicina	8-35
Histidina	0,09-0,7
Isoleucina	0,9-1,7
Leucina	1-1,8
Lisina	0,8-1,6
Metionina	0,1-0,5
Fenilalanina	0,2-1
Prolina	0,5-4
Serina	0,1-0,8
Treonina	0,7-1,5

TABLA 2	
Aminoácido	Concentración of aminoácidos en el medio (mM)
Triptófano	0,08-0,3
Tirosina	0,2-3
Valina	0,8-1,6

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un medio de cultivo en el que la glicina está a una concentración desde 5 mM a 30 mM, y en el que uno o más aminoácidos distintos a la glicina tienen concentraciones de o por debajo de las concentraciones enumeradas en la Tabla 3. Por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, u once aminoácidos pueden tener concentraciones de o por debajo de las concentraciones enumeradas en la Tabla 3. En una realización, la concentración de lisina en el medio de cultivo está entre 0,5 mM y 5,0 mM. Otros aminoácidos no identificados en la Tabla 2 pueden estar presentes en el medio de cultivo, por ejemplo, a las concentraciones en los intervalos enumerados en la Tabla 2.

Tabla 3: Concentraciones máximas ejemplares de aminoácidos particulares en medios de cultivos de ciertas realizaciones de la presente divulgación

TABLA 3		
Aminoácidos	Concentración de aminoácidos en el medio (mM)	Concentración de aminoácidos en el medio (mg/L)
Asparagina	2 mM	264
Ácido Aspártico	2 mM	266
Isoleucina	2 mM	262
Leucina	2,5 mM	328
Lisina	6 mM	876
Metionina	0,45 mM	67
Serina	4 mM	420
Treonina	4 mM	476
Triptófano	0,3 mM	61
Tirosina	2,5 mM	145
Valina	1,8 mM	211

En otros aspectos, la divulgación proporciona un medio de cultivo en el que la glicina está a una concentración de 5 mM a 30 mM, y en el que uno o más aminoácidos distintos de la glicina tienen concentraciones de o por debajo de las concentraciones enumeradas en la Tabla 4. Por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once aminoácidos pueden tener concentraciones de o por debajo de las concentraciones de o por debajo de las concentraciones enumeradas en la Tabla 4. Otros aminoácidos no identificados en la Tabla 3 pueden estar presentes en el medio de cultivo, por ejemplo, a las concentraciones en los intervalos enumerados en la Tabla 2.

Tabla 4: Concentraciones máximas ejemplares de aminoácidos particulares en los medios de cultivo de ciertas realizaciones de la presente divulgación

TABLA 4		
Aminoácidos	Concentración de aminoácidos en el medio (mM)	Concentración de aminoácidos en el medio (mg/L)
Asparagina	1,5 mM	198
Ácido Aspártico	1,5 mM	200
Isoleucina	1,5 mM	197
Leucina	2 mM	262
Lisina	4 mM	584

TABLA 4		
Aminoácidos	Concentración de aminoácidos en el medio (mM)	Concentración de aminoácidos en el medio (mg/L)
Metionina	0,4 mM	60
Serina	2 mM	210
Treonina	2 mM	238
Triptófano	0,2 mM	41
Tirosina	1,5 mM	128
Valina	1,5 mM	178

Adicionalmente, los medios de cultivo de la presente divulgación pueden contener una variedad de vitaminas. Las vitaminas típicas incluyen pero no se limitan a, vitamina B-12, biotina, colina, ácido fólico, niacinamida, pantotenato cálcico, hidrocloreto de piridoxal, riboflavina e hidrocloreto de tiamina. Las vitaminas se pueden utilizar adecuadamente en los intervalos de concentración que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones ejemplares de vitaminas en los medios de cultivo de la presente divulgación

TABLA 5	
Vitamina	Concentración de Vitaminas en el Medio (mM)
Vitamina B-12	0,00013-0,002
Biotina	0,00001-0,01
Colina	0,016-1,3
Ácido Fólico	0,0015-0,02
Niacinamida	0,002-0,07
Pantotenato cálcico	0,012-0,02
Hidrocloreto de Piridoxal	0-0,04
Riboflavina	0,00015-0,0023
Hidrocloreto de tiamina	0-0,3

Adicionalmente, los medios de cultivo celular de la presente divulgación pueden contener una variedad de elementos traza. Los elementos traza típicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro cálcico anhidro, cloruro magnésico anhidro, sulfato magnésico anhidro, cloruro potásico y fosfato sódico dibásico anhidro. Los elementos traza se pueden utilizar adecuadamente en los medios de cultivo en intervalos de concentración que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones ejemplares de elementos traza en los medios de cultivo de la presente divulgación

TABLE 6	
Elemento Taza	Concentración de Elementos Taza en el Medio (mM)
Cloruro cálcico anhidro	0,2-1,1
Cloruro magnésico anhidro	0,1-1,
Sulfato magnésico anhidro	0,1-1,1
Cloruro potásico	2-8
Fosfato sódico dibásico anhidro	0,5-5

Los medios de cultivo pueden incluir también al menos una fuente de energía. Ejemplos de fuentes de energía que se pueden incluir en el cultivo celular incluyen glucosa, manosa, galactosa, maltosa y fructosa. La glucosa se puede añadir al medio de cultivo a una concentración que varía desde 5 g/l a 20 g/l.

Los medios de cultivo de la presente divulgación también pueden contener un tampón. Se utiliza un tampón para mantener el cultivo celular a un pH adecuado. Los tampones que se pueden utilizar en el medio de cultivo incluyen,

pero no se limitan a HEPES, tampón de fosfato (por ejemplo fosfato sódico mono y dibásico) y carbonato sódico. El tampón se puede utilizar para mantener un pH del medio de cultivo en un intervalo aceptable, normalmente a un pH que varía desde 6,5 a 7,5 y más normalmente a un pH que varía desde 6,8 a 7,2.

- 5 Los medios de cultivo pueden contener sales para regular la osmolalidad. Por ejemplo, se añade normalmente un regulador de la osmolalidad para mantener la osmolalidad del medio de cultivo en un intervalo entre 250-400 mili-Osmoles (mOsm), y más normalmente entre 270-350 mOsm. Los reguladores de la osmolalidad característicos incluyen sales tales como el cloruro sódico o el cloruro potásico. Un experto en la técnica apreciará que las cantidades altas de glicina en un medio de cultivo afectará la osmolalidad del medio. En consecuencia, la osmolalidad del medio de cultivo se puede mantener en un intervalo apropiado reduciendo la cantidad de regulador de la osmolalidad añadido al medio después de tener en cuenta la osmolalidad a la que contribuye os altos niveles de glicina.

- 15 Los medios de cultivo de la presente divulgación también pueden contener un factor lipídico. Los factores lipídicos típicos, incluyen, pero no se limitan a ácido lipóico, cloruro de colina, ácido oleico, y fosfatidilcolina.

5.2 Glicoproteínas

- 20 La presente divulgación proporciona glicoproteínas enriquecidas en glicofomas no fucosiladas. La sección 5.2.1 describe anticuerpos que se pueden producir por métodos de la presente divulgación. La sección 5.2.2 describe otros tipos de glicoproteínas que se pueden producir por los métodos de la divulgación.

5.2.1. Anticuerpos

- 25 Los anticuerpos (Ab) e inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan la especificidad de unión para una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo que carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos e inmunoglobulinas son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo.

- 35 La presente divulgación proporciona anticuerpos enriquecidos en glicofomas no fucosiladas. A menos de que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactivo con, un antígeno en particular, e incluye, formas de anticuerpo policlonales, monoclonales, modificados genéticamente y modificados de otra manera, incluyendo pero no limitadas a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos), y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, y scFv. Además, a menos de que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) quiere decir que incluye tanto moléculas intactas, así como, fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación del animal, y pueden tener una unión menos no específica que in anticuerpo intacto (Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med.24:316). El término "scFv" se refiere a una cadena sencilla Fv de anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena.

- 45 Las referencias a "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a "VL" se refieren a una región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

- 55 Los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada tienen regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones marco conservadas (FR). Como se conoce en la técnica, la posición/límite de aminoácidos que delimita una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las distintas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones del dominio variable se pueden ver como posiciones hipervariables híbridas en las que esas posiciones se pueden considerar que están en una región hipervariable en un grupo de criterios mientras que se consideran fuera de una región hipervariable en un grupo de criterios diferente. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en las regiones hipervariables extendidas. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987). Como se utiliza en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la inmunoglobulina se hace de acuerdo con el sistema de numeración de aminoácidos de inmunoglobulina de Kabat, et al., a menos de que se indique otra cosa.

También se pueden producir fragmentos de anticuerpo utilizando las composiciones y métodos de la divulgación. La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a la diana o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Un fragmento "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a la diana completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en una estrecha asociación no covalente (dímero VH-VL). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúa para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero VH-VL. A menudo, las seis CDR confieren la especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, en algunos casos incluso un único dominio variable (o medio de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para una diana) pueden tener la capacidad de reconocer y unirse a una diana. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que capacita al scFv para formar la estructura deseada para unirse a la diana. Los "anticuerpos de dominio único" están compuestos por un único dominio VH o VL que presenta afinidad suficiente por la diana. En una realización específica, el anticuerpo de dominio único es un anticuerpo camelizado (véase, por ejemplo, Riechmann, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:25-38).

El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por la escisión del enlace disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión por pepsina del F(ab')₂. Se conocen acoplamientos químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo por los expertos habituados en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnologías de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el que se produce. Los anticuerpos monoclonales útiles en la presente divulgación se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de fago de presentación, o una combinación de las mismas. Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados, o humanos.

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. El término anticuerpo "quimérico" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como de un anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulina humana, normalmente que se escogen de una matriz de inmunoglobulina humana. Los métodos de producción de anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214-221; Gillies et al., 1985, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Patente de EE. UU. N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden ser humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otros subdominios de unión a la diana de anticuerpos) que contienen mínimas secuencias derivadas de una inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización de anticuerpos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-7; Patente de EE. UU. N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 de Queen et al.; documento EP239400; publicación PCT WO 91/09967; Patente de EE. UU. N° 5.225.539; documento EP592106; documento EP519596; Padlan, 1991, *Mol. Immunol.*, 28:489-498; Studnicka et al., 1994, *Prot. Eng.* 7:805-814; Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969-973; y Patente de EE. UU. N° 5.565.332.

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden ser anticuerpos humanos. Los anticuerpos completamente "humanos" pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que o expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos se pueden producir por una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de fagos de presentación utilizando bibliotecas de anticuerpos de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase, las Patentes de EE. UU. N° 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos se pueden producir también utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patentes de EE. UU. N° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

Además, pueden contratarse compañías tales como Medarex (Princeton, NJ), Astellas Pharma (Deerfield, IL), y Regeneron (Tarrytown, NY) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando una tecnología similar a la que se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica a la que se hace referencia como "selección guiada". En esta estrategia se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., 1988, *Biotechnology* 12:899-903).

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden ser primatizados. La expresión "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para producir anticuerpos primatizados se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. N° 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, a menudo humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes.

Los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación incluyen anticuerpos derivados. Por ejemplo, pero no por medio de limitación, los anticuerpos derivados se modifican normalmente por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos bloqueantes/protectores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo, utilizando la tecnología ambrix (véase, por ejemplo, Wolfson, 2006, *Chem. Biol.* 13(10):1011-2).

En otra realización más de la divulgación, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos cuya secuencia se ha modificado para alterar una función biológica efectora mediada por una región constante con respecto a la secuencia de tipo silvestre correspondiente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación se puede modificar para reducir al menos una función biológica efectora mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo no modificado, por ejemplo, la reducción de la unión al receptor Fc (FcR). La unión al FcR se puede reducir mutando el segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo en regiones particulares necesarias para las interacciones con el FcR (véase, por ejemplo, Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491; y Lund et al., 1991, *J. Immunol.* 147:2657-2662).

En otras realizaciones, los anticuerpos producidos utilizando los métodos y composiciones de la divulgación modificados para adquirir o mejorar al menos una función biológica efectora mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo no modificado, por ejemplo, para aumentar las interacciones con el FcγR (Véase, por ejemplo, el documento US 2006/0134709). Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo con una región constante que se une al FcγRIIA, FcγRIIB y/o FcγRIIIA con mayor afinidad que la correspondiente a la región constante de tipo silvestre de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Ejemplos de anticuerpos que se pueden producir utilizando los métodos de la presente divulgación incluyen pero no se limitan a adalimumab, elotuzumab, enavatuzumab, daclizumab, voloxicimab, tositumomab, trastuzumab, istekinumab, abcicimab, besilesomab, etaracizumab, pemtumomab, omalizumab, pertuzumab, natalizumab, sulesomab, tefibazumab, votumumab, motavizumab, oregovomabm, panitumumab, zalutumumab, igovomab, bevacizumab, basiliximab, atlizumab, bectumomab, belimumab, alemtuzumab, nimotuzumab, mepolizumab, altumomab, ranibizumab, rituximab, palvizumab, gemtuzumab, golimumab, fontolizumab, nofetumomab, ofatumumab, arcitumomab, cetuximab, imciromab, certolizumab, rovelizumab, ruplizumab, ipilimumab, labetuzumab, catumaxomab, canakinumab, denosumab, eculizumab, fanolesomab, efalizumab, infliximab, edrecolomab, efungumab, girentuximab, ertumaxomab y toclizumab.

5.2.2. Otras glicoproteínas

Los métodos de la divulgación se pueden utilizar para producir glicoproteínas de cualquiera proteína, incluyendo proteínas con fines terapéuticos. Ejemplos de proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a factores de crecimiento tal como al eritropoyetina (EPO), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), antitrombina III, interleucina 1,

interleucina 2, interleucina 6, gonadotropina coriónica humana (hCG), antitrombina III, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factores de coagulación tales como el factor VIII, factor IX y proteína C humana, factor de crecimiento epidérmico, factor liberador de hormona de crecimiento, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, factor 2 de crecimiento endotelial y activador de plasminógeno.

5.3. Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

Se pueden utilizar metodologías de ADN recombinante convencionales tales como las que se describen en Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la Patente de EE. UU. N° 4.816.397 para producir células de mamífero recombinantes adecuadas para la producción de glicoproteínas de acuerdo con los métodos de la divulgación.

Las secuencias de glicoproteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. En realizaciones en las que la glicoproteína es un anticuerpo, se pueden utilizar técnicas recombinantes para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en las células huésped. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión que albergan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de manera que se expresan las cadenas ligera y pesada en la célula huésped y, opcionalmente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir del cual se pueden recuperar los anticuerpos. Para generar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos, los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada se obtienen primero. Estos ADN se obtienen por amplificación y modificación del ADN de la línea germinal o el ADNc que codifica las secuencias variables de la cadena ligera y pesada, por ejemplo utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de cadena pesada y ligera humanas se conocen en la técnica (véase por ejemplo, la base de datos de la línea germinal humana "VBASE"; véase también E. A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:116-198; y Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836).

Se puede sintetizar un fragmento de ADN que codifica la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo y utilizarse como una matriz para la mutagénesis para generar una variante como se describe en el presente documento utilizando técnicas de mutagénesis rutinarias; de manera alternativa, se puede sintetizar directamente un fragmento de ADN que codifica la variante.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican el anticuerpo, se pueden modificar estos fragmentos de ADN por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab, o a genes de scFv. En estas modificaciones, un fragmento de ADN que codifica una VL o VH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unida operativamente", como se utiliza en este contexto, tiene la intención de significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN se mantienen en fase.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica la VH u otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, CH3 y, opcionalmente, CH4). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humanas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero en ciertas realizaciones es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica la VH puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifique solo la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica la VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y se pueden obtener los fragmentos de ADN que engloban estas regiones por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero en ciertas realizaciones es una región constante kappa. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifican la secuencia de aminoácidos (Gly₄~Ser)₃ (SEQ ID NO: 21), de manera que las secuencias VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible

(véase, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554).

Para expresar las glicoproteínas, los ADN que codifican la glicoproteína se insertan en vectores de expresión de manera que los genes estén unidos operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unidos operativamente" pretende significar que una glicoproteína que codifica un ácido nucleico está unido a un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional del vector sirven su función pretendida de regulación de la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la glicoproteína. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen para ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. Cuando la glicoproteína es un anticuerpo, el gen de la cadena ligera y el gen de la cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en vectores distintos o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los ácidos nucleicos que codifican la glicoproteína pueden insertarse en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, por unión en los sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y el vector, o unión de extremo como si no existen sitios de restricción). Cuando la glicoproteína es un anticuerpo, antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada del anticuerpo, el vector de expresión puede albergar ya las secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias VH y VL de anticuerpo en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena ligera y la región constante de cadena pesada, respectivamente, de manera que el segmento VH esté unido operativamente a los segmentos de CH en el vector y el segmento VL está unido operativamente al segmento CL en el vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo por una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido de señal está unido en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulina).

Los vectores de expresión recombinante pueden albergar secuencias reguladoras que controlan la expresión de las secuencias codificantes de la glicoproteína en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, amplificadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, que incluye las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o amplificadores derivados del citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/amplificador CMV), poliovirus de Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador SV40), adenovirus (por ejemplo el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Para una descripción adicional de elementos reguladores víricos, y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.168.062 de Stinski, Patente de EE. UU. N° 4.510.245 de Bell et al., y Patente de EE. UU. N° 4.968.615 de Schaffner et al.

Los vectores de expresión recombinantes pueden albergar secuencias adicionales, tal como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores genéticos. El gen de marcador genético facilita la selección de células huésped en los que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador genético confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores genéticos adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en selección/amplificación de células huésped DHFR⁺ con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector de expresión que codifica las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por técnicas convencionales. Las distintas formas del término "transfección" tienen la intención de englobar una amplia variedad de técnicas que se utilizan comúnmente para la introducción de un ADN exógeno en una célula huésped de mamífero.

Las glicoproteínas de la divulgación se pueden expresar en células huésped de mamífero, para la secreción óptima de una proteína plegada apropiadamente e inmunológicamente activa. Las células huésped de mamífero ejemplares para la expresión de anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO DHFR⁺, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, que se utilizaron con un marcador genético DHFR, por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, células SP2/0, células EB66®, y células PER.C6®. Cuando se introducen los vectores de expresión recombinantes que codifican glicoproteínas en células huésped de mamífero, las glicoproteínas se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de la glicoproteína en las células huésped o la secreción de la glicoproteína en el medio de

cultivo en el que se cultivan las células huésped. Las técnicas de cultivo adecuadas se describen en la Sección 5.4. Las glicoproteínas se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales, por ejemplo, como se describen en la Sección 5.5.

5 5.4. Métodos de cultivo

La divulgación proporciona métodos para producir glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos) cultivando células de mamífero modificadas para expresar las glicoproteínas en un medio de cultivo alto en glicina, tal como un medio de cultivo descrito en la Sección 5.1. Los métodos de la divulgación proporcionan glicoproteínas con glicoformas fucosiladas reducidas en comparación con las glicoproteínas producidas en medios de cultivo tradicionales.

Las células de mamífero recombinantes descritas en la Sección 5.3 se pueden cultivar en suspensión, tal como por cultivo en matraces con agitado en una fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continua, discontinua, semi-continua, o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales que se llevan a cabo en un medio adecuado y en condiciones que permiten que se exprese y/o se aísle la glicoproteína. De manera alternativa, las células de mamífero se pueden cultivar mientras se acoplan a un sustrato sólido.

En realizaciones particulares, las células de mamífero recombinantes se añaden al medio básico a una densidad celular inicial en el intervalo de $0,5-5 \times 10^5$ células/ml y más normalmente en el intervalo de $1,5-2,5 \times 10^5$ células/ml. Los cultivos se recolectan generalmente aproximadamente a los 8 días a 20 días después de la inoculación, y más normalmente entre 10 días a 14 días después de la inoculación.

Después de la inoculación de las células de mamífero, el cultivo de las células se puede promover por la adición de nutrientes de acuerdo con un calendario de alimentación pre-determinado. La adición del medio de alimentación al cultivo puede ser mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como el cultivo continuo, cultivo discontinuo y cultivo semi-continuo. Para apoyar la propagación de las células, se puede añadir una solución de alimentación al cultivo en momentos intermitentes después de la inoculación. Como se utiliza en el presente documento, el término "alimentación" se refiere a nutrientes que se añaden al cultivo tras la inoculación. La expresión "solución de alimentación" o "medio de alimentación" se refiere a una solución que contiene la alimentación que se añade al cultivo después de la inoculación.

5.5. Recuperación y purificación

Las técnicas para la recuperación y purificación de la proteína expresada se conocen bien en la técnica y se puede hacer a medida de la glicoproteína(s) particular que se va a expresar por la célula de mamífero recombinante. Las glicoproteínas se pueden recuperar del medio de cultivo y/o los lisados celulares. En las realizaciones en las que el método se dirige a la producción de una glicoproteína secretada, la glicoproteína se puede recuperar del medio de cultivo. Las proteínas se pueden recuperar o purificar del medio de cultivo por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. La glicoproteína pueden entonces purificarse adicionalmente por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, hidrofobia, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico de preparación (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación en sulfato amónico), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, New York, 1989).

En las realizaciones en las que la glicoproteína es un anticuerpo, el anticuerpo puede purificarse por un proceso que utiliza cromatografía de afinidad por Proteína A en conjunción con una cromatografía de intercambio aniónico fuerte (Q-Sepharose) e intercambio catiónico débil (CM-650M), permitiendo un procedimiento de flujo continuo sin dilución del proceso intermedio. Este método para obtener un anticuerpo purificado puede implicar las siguientes etapas:

- (i) cromatografía de afinidad a Proteína A para aislar el anticuerpo de otros componentes del cultivo celular;
- (ii) inactivación vírica a pH bajo;
- (iii) cromatografía de intercambio aniónico fuerte para retirar el ADN;
- (iv) cromatografía de intercambio catiónico débil para reducir los agregados; y
- (v) filtración para retirar los virus.

Las etapas (ii)-(v) se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

Una vez aislado, un anticuerpo puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de altas prestaciones (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work y Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden).

5.6. Glicoformas proteicas

La modificación post-traducciona de una proteína por glicosilación puede tener influencia en las propiedades bioquímicas y físicas de la proteína. Por ejemplo, las propiedades de un anticuerpo pueden influenciarse por la glicosilación en las regiones Fc y Fab del anticuerpo. La "glicosilación" se refiere a la modificación covalente de proteínas (por ejemplo, anticuerpos) con carbohidratos (por ejemplo, cadenas de oligosacáridos). Los azúcares típicos en glicoproteínas incluyen la manosa, glucosa, galactosa, fucosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico.

Se hace referencia a las moléculas individuales glicosiladas (por ejemplo, los anticuerpos glicosilados) en el presente documento como glicoformas. El "perfil de glicosilación" se refiere al grupo de glicoformas en una muestra particular. La glicosilación se refiere en general a la glicosilación unida a N o la glicosilación unida a O. La expresión "glicosilación unida a N" se refiere a la unión covalente de una cadena de oligosacárido a un resto de asparagina de una proteína, formando de esta manera oligosacáridos unidos a N. También se hace referencia a los oligosacáridos unidos a N como glucanos unidos a N. La expresión "glicosilación unida a O" se refiere a la unión covalente de una cadena de oligosacárido al grupo hidroxilo de un resto de serina o treonina de una proteína, formando de esta manera oligosacáridos unidos a O. También se hace referencia a los oligosacáridos unidos a O como glucanos unidos a O.

Los glucanos unidos a N se caracterizan adicionalmente por el número de restos de galactosa en sus extremos, contengan o no una fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N. Se hace referencia a los glucanos unidos a N que tienen una molécula de fucosa unida a la N-acetilglucosamina como glucanos unidos a N fucosilados. Se hace referencia a las proteínas con glucanos unidos a N fucosilados en el presente documento como glicoformas fucosiladas. Las características de cuatro glucanos unidos a N fucosilados diferentes se enumeran posteriormente (también véase la **FIGURA 1**):

- G0: Estructura central biantenaria (es decir, que tiene dos antenas) con la fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N y una N-acetilglucosamina en cada rama de la estructura central.
- G1: Estructura central biantenaria con la fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N, una N-acetilglucosamina en cada rama de la estructura central y una galactosa terminal en una rama de la estructura central.
- G2: Estructura central biantenaria con una fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N, una N-acetilglucosamina y una galactosa terminal en cada rama de la estructura central.
- G0-GlcNAc: Estructura central biantenaria con fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N, una N-acetilglucosamida en una rama de la estructura central y sin galactosa terminal.

Se hace referencia a los glucanos unidos a N que no contienen una molécula de fucosa como glucanos no fucosilados. Se hace referencia a los glucanos no fucosilados como glicoformas no fucosiladas. Por ejemplo, un glucano unido a N G0-GlcNAc-Fucosa tiene una estructura central biantenaria sin fucosa unida a la N-acetilglucosamina unida a N, una N-acetilglucosamina en una rama de la estructura central y sin galactosa terminal. Se hace referencia a un anticuerpo que contiene un glucano unido a N G0-GlcNAc-Fucosa como una glicoforma unida a N G0-GlcNAc-Fucosa.

Los perfiles de glicosilación unida a N se pueden evaluar por distintos métodos. Por ejemplo, los perfiles de glicosilación unidos a N pueden evaluarse digiriendo el anticuerpo con tripsina y analizando la mezcla peptídica resultante utilizando una cromatografía de fase inversa con detección por espectrometría de masas y cuantificación de los distintos glicopéptidos. En un método específico, los péptidos digeridos se analizan utilizando una columna de fase inversa ODS-AQ YMC-Pack, con un tamaño de partícula de 5 µm, tamaño de poro 120 Ångströms, de 2,0 mm x 250 mm (YMC Co., Ltd, número de catálogo AQ12S05-2502WT) y los péptidos eluidos se detectan y cuantifican utilizando un espectrómetro de masas LCQ Deca XP+ (Thermo Finnigan). La abundancia relativa de cada glicoforma se determina basándose en el área del pico del cromatograma iónico extraído por la espectrometría de masas de los glicopéptidos correspondientes con respecto a la suma de las áreas del pico de todos los glicopéptidos observados.

De manera alternativa, los perfiles de glicosilación unida a N se pueden evaluar por escisión de los oligosacáridos unidos a n con amidasa PNGasa F, derivatizando los oligosacáridos con un marcador fluorescente y analizando la mezcla resultante mediante HPLC de fase normal con detección fluorescente. En un método específico, los glucanos unidos a N derivatizados, escindidos se re-disuelven a 50 °C en una columna NH2P-504E Asahipak Amino unido a amina polimérica de 250 x 4,6 mm (tamaño de partícula 5 mm, Phenomenex, Nº de cat. CHO-2628).

Los estudios del perfil de glicosilación de IgG han revelado que la IgG alberga al menos 30 oligosacáridos unidos a N diferentes. Véase Dwek et al., 1995, J. Anat. 187:279-292. Los sitios de glicosilación unida a N se encuentran tanto en la región Fc como en las regiones Fab de muchos anticuerpos. Se hace referencia a menudo a los oligosacáridos unidos a N sin ningún grupo de ácido siálico como oligosacáridos unidos a N neutros. Se hace

referencia a los oligosacáridos unidos a N con uno o dos grupos de ácido siálico y el extremo del azúcar no reductor del oligosacárido como oligosacáridos unidos a N monosializados o disializados, respectivamente. Con respecto a la IgG, la glicosilación se caracteriza por una baja incidencia de estructuras monosializadas y disializadas mientras que la glicosilación de Fab se caracteriza por una alta incidencia de estructuras monosializadas y disializadas.

Se han identificado glucanos unidos a N adicionales en la región Fc de los anticuerpos. Por ejemplo, se hace referencia a los glucanos que contienen altas cantidades de manosa que caracterizan por glucanos que solo contienen dos N-acetilglucosaminas conteniendo el resto de residuos de manosa como "glucanos altos en manosa". Los restos de manosa están unidos covalentemente a una GlcNAc en la posición 2 del oligosacárido. Un ejemplo de un glucano de cinco manosas es el "glucano 5Manosas". Los glucanos 5Manosas contienen 5 restos de manosa. Se hace referencia a las proteínas con glucanos 5Manosas en el presente documento como "glicoformas 5Manosas". Los glucanos altos en manosa son ejemplos de glucanos no fucosilados.

La presente divulgación proporciona métodos de producción de anticuerpos enriquecidos en glicoformas que no contienen fucosa (es decir, glicoformas no fucosiladas). Ejemplos de glicoformas no glicosiladas incluyen, pero no se limitan a glicoformas G0-GlcNAc-Fucosa y glicoformas 5Manosas. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con un aumento de la actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Los linfocitos, particularmente las células citotóxicas naturales (NK), contienen receptores de unión en la superficie que son capaces de unirse a la región Fc de los anticuerpos. Por ejemplo, el receptor CD16a humano de las células NK se une a la región Fc de un anticuerpo unido a una célula diana, iniciando de esta manera la destrucción de la célula diana. Sin estar ligados por teoría alguna, se cree que las glicoformas no fucosiladas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación presentan una afinidad de unión más alta para el receptor DC16a de las células NK que las glicoformas que contienen fucosa (es decir, las glicoformas fucosiladas), que es responsable del aumento de la actividad ADCC.

Los anticuerpos producidos en medios altos en glicina como se describen en el presente documento contienen significativamente más glicoformas no fucosiladas que los anticuerpos producidos en medios convencionales. Como se describe en la Sección 5.3, la cantidad de glucanos que carecen de fucosa aumentan en general según aumenta la concentración de glicina en el medio de cultivo desde 2 mM a 30 mM. En particular el porcentaje de glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas aumenta cuando se cultivan células NS0 en el medio de cultivo producido de acuerdo con la presente divulgación. Aunque la cantidad de anticuerpos no fucosilados producidos en el medio de cultivo de la presente divulgación depende del AOI, el aumento del porcentaje de glucanos que carecen de fucosa es en general al menos un 120% con respecto a los anticuerpos producidos en un medio convencional (es decir, un medio con concentraciones de glicina de 2 mM o menos). Por ejemplo, el aumento del porcentaje del total de glucanos que carecen de fucosa en los anticuerpos producidos en un medio de cultivo de la presente divulgación puede ser del 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% o 400% con respecto a los anticuerpos producidos en medios convencionales. En realizaciones específicas, el aumento del porcentaje en glucanos que carecen de fucosa en los anticuerpos producidos por los métodos de la divulgación con respecto a los anticuerpos producidos en medios básicos convencionales pueden unirse por cualquiera de dos de los valores anteriores, tal como, pero sin limitarse a, 120-150%, 150-180%, 150-200%, o 200-300%.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos particulares de interés con perfiles de glicosilación alterados con respecto a los anticuerpos producidos en medios convencionales. En particular, los anticuerpos producidos por la presente divulgación tienen un porcentaje mayor de glicoformas no fucosiladas que los anticuerpos producidos en medios convencionales. Como resultado, los anticuerpos producidos por los métodos de la presente divulgación generalmente presentan una actividad ADCC mayor que los anticuerpos producidos en medios convencionales y muestran una mayor unión al receptor CD16a de las células NK.

En una realización particular, los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal que tiene una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia como elotuzumab (HuLuc 63), se desveló en la Publicación de Patente de EE. UU. N° 2006/0024296 y tiene regiones VH y VL de SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 44, respectivamente. El elotuzumab tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 4. El elotuzumab presenta una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en células primarias de mieloma y en actividad antitumoral *in vivo* (Hsi et al., (2008) Clin. Cancer Res. 14(9):2775).

La divulgación proporciona una composición que comprende una población de moléculas de elotuzumab, donde al menos el 4% de los glucanos carecen de fucosa, que se producen de acuerdo con los procedimientos de cultivo celular de la presente divulgación. Por ejemplo, al menos un 4%, al menos un 5%, al menos un 6%, al menos un 7% o al menos un 8% de los glucanos del elotuzumab carecen de fucosa. En realizaciones particulares, los glucanos no fucosilados de elotuzumab producidos de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a glucanos unidos a N tales como glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas. En estas realizaciones, al menos un 4% de los glucanos unidos a N carecen de fucosa. En otras realizaciones, la divulgación proporciona moléculas de elotuzumab que tienen al menos un 2,5% del total de glucanos presentes son glucanos 5Manosas. Por ejemplo, al menos un 3%, al menos un 4%, al menos un 5% de los glucanos en el elotuzumab

pueden estar presentes como glucanos 5Manosas.

En otra realización, los métodos de la presente divulgación pueden utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal que tiene una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia como daclizumab, es un anticuerpo IgG1 humanizado que se une específicamente a la subunidad alfa (a la que también se hace referencia como CD25 o Tac) del receptor de interleucina 2 humana (IL-2R), que es un mediador importante de la activación de linfocitos. El daclizumab tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 8.

La divulgación proporciona una composición que comprende una población de moléculas de daclizumab, donde al menos el 3% de los glucanos carece de fucosa, que se producen de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación. Por ejemplo, al menos un 3%, al menos un 4%, al menos un 5%, al menos un 6%, al menos un 7%, o al menos un 8% de los glucanos en el daclizumab que carecen de fucosa. En realizaciones particulares, los glucanos no fucosilados del daclizumab producidos de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a glucanos unidos a N tales como los glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas. En estas realizaciones, al menos el 3% de los glucanos unidos a N carecen de fucosa. En otras realizaciones, la divulgación proporciona moléculas de daclizumab que tienen al menos un 2% del total de los glucanos presentes son glucanos 5Manosas. Por ejemplo, al menos el 3%, al menos el 4% o al menos el 5% de los glucanos en el daclizumab pueden estar presentes como glucanos 5Manosas.

En otra realización, los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal que tiene una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia como voloxicimab, es un anticuerpo monoclonal (mAb) IgG4 quimérico (82% humano, 18% murino) de alta afinidad que se une específicamente a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ que se utiliza para el tratamiento de una variedad de tumores en un estadio avanzado. El voloxicimab tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 12.

La divulgación proporciona una composición que comprende una población de moléculas de voloxicimab, donde al menos el 1% de los glucanos carecen de fucosa, que se produce de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación. Por ejemplo, al menos el 1% de los glucanos en el voloxicimab carece de fucosa. En realizaciones particulares, los glucanos no fucosilados del voloxicimab producidos de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a glucanos unidos a N tales como los glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas. En estas realizaciones, al menos un 1% de los glucanos unidos a N carecen de fucosa. En otras realizaciones, la divulgación proporciona moléculas de voloxicimab que tienen al menos un 0,5% de los glucanos totales presentes como glucanos 5Manosas.

En otra realización, los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal que tiene una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia como PDL241, es un anticuerpo IgG1 humanizado que se une a la proteína CS1 (pero a un epítipo diferente que el elotuzumab). El PDL241 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 16.

La divulgación proporciona una composición que comprende una población de moléculas de PDL241, donde al menos el 14% de los glucanos carece de fucosa, que se producen de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación. Por ejemplo, al menos un 14%, al menos un 15%, al menos un 16%, al menos un 17%, al menos un 18%, o al menos un 19% de los glucanos en el PDL241 que carecen de fucosa. En realizaciones particulares, los glucanos no fucosilados del PDL241 producidos de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a glucanos unidos a N tales como los glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas. En estas realizaciones, al menos el 14% de los glucanos unidos a N carecen de fucosa. En otras realizaciones, la divulgación proporciona moléculas de PDL241 que tienen al menos un 8% del total de los glucanos presentes son glucanos 5Manosas. Por ejemplo, al menos el 9%, al menos el 10%, al menos el 11% o al menos el 12% de los glucanos en el PDL241 pueden estar presentes como glucanos 5Manosas.

En otra realización, los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal que tiene una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia como enavatuzumab (PDL192) es un anticuerpo humanizado IgG1 contra TweakR que presenta actividad anti-tumoral en modelos pre-clínicos mediante dos mecanismos: señalización directa mediante TweakR y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. El enavatuzumab tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa de SEQ ID NO: 20.

La divulgación proporciona una composición que comprende una población de moléculas de enavatuzumab, donde al menos el 5% de los glucanos carece de fucosa, que se producen de acuerdo con el procedimiento de cultivo

celular de la presente divulgación. Por ejemplo, al menos un 5%, al menos un 6%, al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, o al menos un 10% de los glucanos en el enavatuzumab que carecen de fucosa. En realizaciones particulares, los glucanos no fucosilados del enavatuzumab producidos de acuerdo con el procedimiento de cultivo celular de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a glucanos unidos a N tales como los glucanos G0-GlcNAc-Fucosa y 5Manosas. En estas realizaciones, al menos el 5% de los glucanos unidos a N carecen de fucosa. En otras realizaciones, la divulgación proporciona moléculas de enavatuzumab que tienen al menos un 2,5% del total de los glucanos presentes son glucanos 5Manosas. Por ejemplo, al menos el 3%, al menos el 4% o al menos el 5% de los glucanos en el elotuzumab pueden estar presentes como glucanos 5Manosas.

- 5
- 10

La Tabla 7 posterior proporciona las secuencias de elotuzumab, daclizumab, voloxicimab, PDL241 y enavatuzumab como se han identificado anteriormente.

Tabla 7: Secuencias de elotuzumab, daclizumab, voloxicimab, PDL241 y enavatuzumab

TABLA 7		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	Región variable de cadena pesada de Elotuzumab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRYSWISWVRQAPGKGLWIGEIINPDSSSTINYAPSLKDKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGLTVTVSS
2	Región variable de cadena ligera de Elotuzumab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGIATAVWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFLTLSISLQPEDVATYYCQYSSYPYTFGGGTKVEIK
3	Secuencia de cadena pesada completa de Elotuzumab	MDFGLIFFIVALLKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRYSWISWVRQAPGKGLWIGEIINPDSSSTINYAPSLKDKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWVDGVVEHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
4	Secuencia de cadena ligera completa de Elotuzumab	METHSQFVYMLLWLSGVEGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGIATAVWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGGTDFLTLSISLQPEDVATYYCQYSSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	Región variable de cadena pesada de Daclizumab	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLTVSS
6	Región variable de cadena ligera de Daclizumab	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLSAGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCHQRSTYPLTFGGGTKVEIKR
7	Secuencia de cadena pesada completa del Daclizumab	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLTVSSGSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVVEHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

(continuación)

TABLA 7		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
8	Secuencia de cadena ligera del Dadizumab	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSISIMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLSASGVPARFSGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQRSTYPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSPVTKSFNR
9	Región variable de la cadena pesada del V _λ oxicimab heavy chain variable region	QVQLKESGPGLVAPSQSLSICTISGFSLTDYGVHWRQPPGKGLEWLVVWSDGSGSTYNSALKSRMTIRKDNSKQVFLIMNSLQTDDSAMYYCARHGYTGMTTGGDALDYWGQGTSTVTVSS
10	Región variable de la cadena ligera del V _λ oxicimab	QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAAITYCHQYLRSPPTFGGGTKLEIKR
11	Secuencia de la cadena pesada completa del V _λ oxicimab	QVQLKESGPGLVAPSQSLSICTISGFSLTDYGVHWRQPPGKGLEWLVVWSDGSGSTYNSALKSRMTIRKDNSKQVFLIMNSLQTDDSAMYYCARHGYTGMTTGGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPS SSLGKTKYTCNV/DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CAVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRWSVLTQLHQLDNLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
12	Secuencia de la cadena ligera completa del V _λ oxicimab	QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAAITYCHQYLRSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNINFPYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Región variable de la cadena pesada del PDL241	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWRQAPGQGLEWIGRIYPGDGDTKYNGKFKGKALTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMIATGAMDYWGQGTSLVTVSS
14	Región variable de la cadena ligera del PD241	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQHHYSTPPYTFGGGTKEIKR

(continuación)

TABLA 7		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
15	Secuencia de cadena pesada completa del PDL241	QVQLVQSGAEVKPGASVK/SCKASGYAFSSSWMNWRQAPGQGLEWIGRIYPCGDGDTKYNGK FKGKATLTADKSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMIATGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVATVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPE VTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKC K/VSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	Secuencia de cadena ligera completa del PDL241	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDRFTGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYSTPPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASW CLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
17	Región variable de la cadena pesada del Enavatuzumab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWSWRQAPGKGLEWVAEIRLKSDNYATHYAE SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTGYADAMDYWGQGLTVTVSS
18	Región variable de la cadena ligera del Enavatuzumab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVSTSSYSYMHWWYQKPKGAPKLLIKYASNLESGVPSRFS GSGSGTDFLTLTISLQPEDFATYYCQHSWEIPTYTFGGGTKEIKR
19	Secuencia de la cadena pesada completa del Enavatuzumab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWSWRQAPGKGLEWVAEIRLKSDNYATHYAE SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTGYADAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVATVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVT C/WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	Secuencia de la cadena ligera completa del PDL241	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVSTSSYSYMHWWYQKPKGAPKLLIKYASNLESGVPSRFS GSGSGTDFLTLTISLQPEDFATYYCQHSWEIPTYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS WCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5.7. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones glicoproteicas descritas anteriormente se pueden suministrar como parte de una composición farmacéutica estéril que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método de administración deseado a un paciente). Las composiciones glicoproteicas se pueden administrar a un paciente mediante una variedad de vías tales como la oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, tópica o local. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá de la glicoproteína en particular, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto. Normalmente, las composiciones glicoproteicas se administrarán por vía intravenosa y subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitaria que contenga una cantidad predeterminada de la composición glicoproteica de la divulgación por dosis. Dicha unidad puede contener por ejemplo, pero sin limitación 0,5 mg a 5 g, por ejemplo, 10 mg a 1 g, o 20 a 50 mg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en la divulgación pueden tener una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo de la afección que se va a tratar o la vía de administración.

Las formulaciones terapéuticas de las composiciones glicoproteicas de la divulgación se pueden preparar para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando la glicoproteína que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales que se emplean normalmente en la técnica (a los que se hace referencia en el presente documento como "vehículos"), es decir, agentes tampón, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes, y otra miscelánea de aditivos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes a una concentración que varía desde aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tampón adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (por ejemplo, una mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, una mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, una mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, una mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampón de oxalato (por ejemplo, una mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, una mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxidos sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico, etc.). Adicionalmente, se pueden utilizar tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Se pueden añadir conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que varían desde 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbenzil amonio, halógenos de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3 pentanol. Se pueden añadir isotonicantes a veces conocidos como "estabilizantes" para asegurar la isotonicidad de composiciones líquidas de la presente divulgación e incluyen azúcares alcoholes polihídricos, por ejemplo azúcares alcoholes trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Estabilizantes se refiere a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente de volumen a un aditivo que solubilice el agente terapéutico o ayuda a evitar la desnaturalización o adherencia a la pared del envase. Los estabilizantes típicos pueden ser azúcar alcoholes polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o azúcares alcoholes, tales como lactosa, trealosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitóles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 restos o menos); proteínas tales como la seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa, disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como la rafinosa; y polisacáridos tales como el dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 de peso por parte de peso de proteína activa.

Se pueden añadir tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar la glicoproteína así como para proteger la glicoproteína contra la agregación inducida por el agitado, que también permite que la formulación se exponga a un esfuerzo de cizalla superficial sin producir la

desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos incluyen los polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietileno sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo aproximadamente de 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y co-disolventes.

5.8. Métodos de tratamiento

5.8.1. Composiciones de Elotuzumab y PDL241

Las composiciones de elotuzumab y PDL241 descritas en la Sección 5.6 son útiles para tratar una variedad de trastornos y afecciones que se piensa que implican el aumento de expresión de la proteína CS1 en células neoplásicas, incluyendo, por ejemplo, mieloma múltiple. Se describen poblaciones de pacientes específicas, formulaciones, modos de administración y cantidades y calendario de dosificación útiles para el tratamiento o prevención del mieloma múltiple en la Patente de EE. UU. N° 7.709.610. Todas estas formulaciones, modos de administración, cantidades y calendarios de dosificación, así como las poblaciones de pacientes específicas y terapias de combinación desveladas son igualmente adecuados para las composiciones de elotuzumab y PDL241 descritas en el presente documento.

Las composiciones y formulaciones de elotuzumab y PDL241 que se describen en el presente documento se administran en cantidades que proporcionan un beneficio terapéutico. El beneficio terapéutico incluye, pero no se limita, al tratamiento del trastorno subyacente. El beneficio terapéutico también puede incluir la mejoría o mejora de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad particular según se evalúa utilizando ensayos diagnóstico y otros convencionales. Para el mieloma múltiple, se describen distintos medios de evaluación del beneficio terapéutico en la Patente de EE. UU. N° 7.709.610. Todos estos distintos ensayos se pueden utilizar para evaluar el beneficio terapéutico en el contexto de pacientes que sufren un mieloma múltiple.

5.8.2. Composiciones de voloxicimab

Las composiciones de voloxicimab descritas en la Sección 5.6 son útiles para tratar una variedad de trastornos y afecciones que se piensa que implican la integridad de $\alpha 5 \beta 1$, incluyendo, por ejemplo, una variedad de tumores sólidos. Las poblaciones de pacientes específicas, formulaciones, modos de administración y cantidades y calendarios de dosificación útiles para el tratamiento o prevención de tumores sólidos, disminución de la angiogénesis y acortamiento de la proliferación celular del cáncer se describen en la Patente de EE. UU. N° 7.662.384. Todas estas formulaciones, modos de administración, cantidades y calendarios de dosificación, así como las poblaciones de pacientes específicas y combinación de terapias desveladas, son adecuados igualmente para las composiciones de voloxicimab descritas en el presente documento.

Las composiciones y formulaciones de voloxicimab descritos en el presente documento se administran en cantidades que proporcionan un beneficio terapéutico. Un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita al tratamiento del trastorno subyacente. El beneficio terapéutico también puede incluir la mejoría o mejora de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad particular como se evalúa utilizando ensayos diagnósticos y otros convencionales. Se describen varios medios para evaluar el beneficio terapéutico en la Solic. publicada de EE. UU. N° 2009/0074762. Todos estos ensayos distintos se pueden utilizar para evaluar el beneficio terapéutico en el contexto de pacientes que sufren cáncer.

5.8.3. Composiciones de Enavatuzumab

Las composiciones de voloxicimab descritas en la Sección 5.6 son útiles para tratar una variedad de trastornos y afecciones que se piensa que implican el receptor Tweak (TweakR), incluyendo, por ejemplo, una variedad de tumores sólidos. Las poblaciones de pacientes específicas, formulaciones, modos de administración y cantidades y calendarios de dosificación útiles para el tratamiento o prevención de tumores sólidos, disminución de la angiogénesis y acortamiento de la proliferación celular del cáncer se describen en la Solicit. publicada de EE. UU. N° 2009/0074762.

Todas estas formulaciones, modos de administración, cantidades y calendarios de dosificación, así como las poblaciones de pacientes específicas y combinación de terapias desveladas, son adecuados igualmente para las composiciones de enavatuzumab descritas en el presente documento.

Las composiciones y formulaciones de enavatuzumab descritos en el presente documento se administran en cantidades que proporcionan un beneficio terapéutico. Un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita al tratamiento del trastorno subyacente. El beneficio terapéutico también puede incluir la mejoría o mejora de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad particular como se evalúa utilizando ensayos diagnósticos y otros convencionales. Se describen varios medios para evaluar el beneficio terapéutico en la Solic. publicada de EE.

UU. N° 2009/0074762. Todos estos ensayos distintos se pueden utilizar para evaluar el beneficio terapéutico en el contexto de pacientes que sufren cáncer.

6. Ejemplos

Los distintos aspectos y características de la invención que se han descrito en el presente documento se describen adicionalmente por medio de los ejemplos, posteriores. Las características que se describen en asociación con una realización (sea en el Sumario anterior o en los ejemplos a continuación) se pueden desviar de la misma sin afectar sustancialmente las propiedades deseables de los métodos y composiciones de la divulgación, y además que diferentes realizaciones pueden combinarse y utilizarse de maneras distintas juntas a menos de que claramente se excluyan mutuamente. En consecuencia, se tiene que entender que los ejemplos que se proporcionan posteriormente tienen la intención de ser ilustrativos y no limitantes, y no se deberían considerar como limitantes de las reivindicaciones siguientes.

6.1. Producción de líneas celulares NS0 estables

6.1.1. Elotuzumab

La línea celular de mieloma de ratón NS0-W (W indica que las células NS0 se deshabituaron gradualmente de sus necesidades de suero y colesterol) como describieron Hartman et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306, se mantuvo en un medio básico libre de proteínas. Las células NS0-W se transfectaron con el ADN plasmídico de expresión pHuLuc63 por electroporación. Los transfectantes que tenían integrado establemente el plásmido de expresión se seleccionaron en presencia de ácido micofenólico en medio DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal. Comenzando a partir de un transfectante de NS0-W que producía un alto nivel de HuLuc63, se llevó a cabo la subclonación por dilución limitada. Se escogió un subclon que tenía una productividad y características del producto aceptables como la línea celular final de producción y se denominó 192-C17.

6.1.2. Daclizumab

Se obtuvo la línea celular NS0 de mieloma de ratón en la Colección de Cultivos Celulares Europea (ECACC, n° de catálogo 85110503, Salisbury, Wiltshire, UK). Se descongeló un vial de estas células NS0 en DMEM suplementado con un 10% de FBS. Las células se cultivaron posteriormente en un medio básico SFM-3 suplementado con 1 mg/ml de BSA. El SFM-3 es una mezcla 1:1 de DMEM y F-12 de Ham suplementada con 10 mg/l de insulina y 10 ug/ml de transferrina. Durante un periodo de aproximadamente 3 meses, las células NS0 se adaptaron al SFM-3 sin suplementos, reduciendo gradualmente la cantidad de FBS presente en el medio de cultivo hasta que se eliminó, y entonces finalmente se retira el BSA en una única etapa. La línea celular huésped resultante se pasó 15-20 veces en SFM-3 y se preparó un banco congelado.

Las células adaptadas al SFM-3 se transfectaron con pHAT.IgG1.rg.dE por electroporación. Los transfectantes que tenían integrado establemente el vector se seleccionaron en presencia de ácido micofenólico en medio DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal. Comenzando a partir de un transfectante NS0 estable que producía un alto nivel de DAC HYP se llevó a cabo la sub-clonación por clonación por dilución limitada o por clasificación activada por fluorescencia (FACS). Se escogió un subclon con productividad y características del producto aceptables como la línea celular final de producción y se denominó 7A11-5H7-14-43.

6.1.3. Voloxicimab

La línea celular productora M200, 46-12, se derivó a partir de las células NS0-W transfectadas con el plásmido de expresión P-200M. Antes de la transfección, las células NS0, que se recibieron del ECACC (ACACC N° 85110503), se adaptaron a condiciones libres de suero y colesterol al PDL y se denominaron NS0-W. Las células NS0-W se transfectaron con el ADN plasmídico de expresión P-200M por electroporación. Los transfectantes que tenían integrado establemente el plásmido de expresión se seleccionaron en presencia de ácido micofenólico en medio DMEM que contenía un 5% de suero bovino fetal. Comenzando con las células NS0-W transfectantes que producían un alto nivel de M200, se llevó a cabo la sub-clonación por clonación por dilución limitada. Se escogió un subclon con productividad y características del producto aceptables como la línea celular final de producción y se denominó 46-12.

6.1.4. PDL241

La línea celular de mieloma de ratón NS0-W (W indica que las células NS0 se deshabituaron gradualmente de sus necesidades de suero y colesterol) como describieron Hartman et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306, se mantuvo en un medio básico libre de proteínas. Las células NS0-W se transfectaron con el ADN plasmídico de expresión PDL241 por electroporación. Los transfectantes que tenían integrado establemente el plásmido de expresión se seleccionaron en presencia de ácido micofenólico en medio DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal. Comenzando a partir de un transfectante de NS0-W que producía un alto nivel de PDL241, se llevó a cabo la subclonación por dilución limitada. Se escogió un subclon que tenía una productividad y características del

producto aceptables como la línea celular final de producción y se denominó 26-5C6.

6.1.5. Enavatuzumab

- 5 La línea celular de mieloma de ratón NS0-W (W indica que las células NS0 se deshabituaron gradualmente a sus necesidades de suero y colesterol) como describieron Hartman et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306, se mantuvieron en un medio básico libre de proteínas. Las células NS0-W se transfectaron con el ADN plasmídico de expresión pHu19.2.1 por electroporación. Los transfectantes que tenían integrado establemente el plásmido de expresión se seleccionaron en presencia de ácido micofenólico en medio DMEM que contenía un 10% de suero
- 10 bovino fetal. Comenzando a partir de un transfectante de NS0-W que producía un alto nivel de PDL192, se llevó a cabo la subclonación por dilución limitada. Se escogió un subclon que tenía una productividad y características del producto aceptables como la línea celular final de producción y se denominó 299-9.

6.2. Producción de anticuerpos

6.2.1. Cultivo celular y recuperación

- Las células se descongelaron de un único vial del banco celular y se expandieron en volúmenes mayores progresivamente en matraces-T, botellas rotatorias, matraces de centrifugación, y biorreactores hasta que se conseguía la escala de producción. Hasta completar el cultivo de producción el fluido de cultivo celular se clarificó por centrifugación y filtración profunda, y se transfirió a un contenedor de mantenimiento de recolección. La duración del cultivo de producción es de aproximadamente 10 días.

- El cultivo celular y la recuperación se pueden llevar a cabo en una variedad de diferentes instalaciones de cultivo celular utilizando un equipamiento convencional, como se conoce en la técnica. En otro ejemplo, las células se descongelan de un único vial del banco celular y se expanden en volúmenes más grandes progresivamente en matraces de agitado y biorreactores hasta que se alcanza la escala de producción. Al completar el cultivo de producción, el fluido de cultivo celular se clarifica por centrifugación y filtración profunda, y se transfirió a un tanque de mantenimiento de recolección. La duración del cultivo de producción es de aproximadamente 10 días.

Preparación del inóculo

- La producción de lotes se inició descongelando un único vial del banco celular. Para generar el medio de control (es decir, sin exceso de glicina), se transfirieron las células a un matraz-T que contenía un medio definido químicamente, Medio Básico Libre de Proteínas-2 (PFBM-2). El polvo a medida para fabricar el PFBM-2 se pudo pedir en Invitrogen pidiendo un polvo de media Hibridoma-SFM preparado sin NaCl, rojo fenol, transferrina, e insulina, que incluía una cantidad de sal sódica de EDTA férrico (III) que, cuando se reconstituía, daba lugar a una concentración de 5 mg/l, y que tenía cantidades del resto de los componentes ajustados de manera que cuando se reconstituía sus concentraciones eran las mismas que el Hibridoma-SFM reconstituido. El medio PFBM-2 preparado contenía los siguientes componentes: 8 g/l de polvo a medida; 2,45 g/l de bicarbonato sódico; 3,15 g/l de NaCl; y 16,5 g/l de D-glucosa monohidrato (15 g/l de glucosa). La concentración de glicina en el medio PFBM-2 era de 2 mM.

- Para producir un medio de glicina, se produce primero el PFBM-2 como se ha descrito anteriormente. Entonces se añade glicina adicional (por ejemplo, 5 mM, 15 mM, o 30 mM) al medio PFBM-2. Para asegurar que el medio alto en glicina tiene aproximadamente la misma osmolalidad que el medio de control PFBM-2, se ajusta la osmolalidad añadiendo un nivel apropiado de NaCl. Por ejemplo, la Tabla 8 muestra la cantidad de NaCl que se añade al medio de control y a los tres medios altos en glicina para alcanzar una osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg.

Tabla 8: Concentración de NaCl en el medio de control y el medio alto en glicina

Tabla 8			
Media	NaCl (g/ l)	Glicina total (mM)	Osmolalidad Final (mOsm/kg)
2 l Control	2,8	2	295
2 l c/ 5 mM Gly extra	2,8	7	298
2 l c/ 15 mM Gly extra	2,5	17	301
2 l c/ 30 mM Gly extra	2,1	32	300

- Las células se expandieron por pasajes en serie en botellas rotatorias o matraces de centrifugación cada dos días a partir de entonces. Los matraces-T, botellas rotatorias, y matraces de centrifugación se colocaron en una incubadora que funcionaba a un punto de temperatura fijado en 37 °C en una atmósfera de 7,5% de CO₂ para los matraces-T y las botellas rotatorias y de un 5% de CO₂ para los matraces de centrifugación.

Los matraces de centrifugación se suplementaron con un 5% de CO₂ bien cubriendo el espacio de cabeza o por rociado en el cultivo, dependiendo del volumen del cultivo, y la velocidad del propulsor se controló a unas revoluciones por minuto (RPM) constantes. La densidad de sembrado deseada en todos los pasajes del inóculo de expansión era aproximadamente de $2,5 \times 10^5$ células viables/ml.

5 Las células se expandieron por pasajes en serie en los matraces de centrifugación cada dos días desde entonces. Los matraces con agitado se colocaron en una incubadora funcionando a un punto de temperatura fijado en 37 °C en una atmósfera con un 7,5% de CO₂.

10 Los matraces con agitado se agitaron a revoluciones por minuto (RPM) constantes en una plataforma de agitado en las incubadoras. La densidad de siembra deseada en todos los pasajes del inóculo de expansión era aproximadamente de $2,2-2,5 \times 10^5$ células viables/ml.

15 Aproximadamente 14 días después de la descongelación del banco celular, cuando se habían producido un número suficiente de células viables, el primero de varios, normalmente tres o cuatro, de los contenedores de agitado de acero inoxidable de los biorreactores de siembra se inoculó. Antes del uso, los biorreactores de siembra se limpiaron en el sitio, se vaporizaron en el sitio, y se cargaron con el volumen apropiado del medio de cultivo PFBM-2. El pH y las sondas de oxígeno disuelto se calibraron antes de que el biorreactor se vaporizara en el sitio. El primer biorreactor de siembra se inoculó con un número de células suficiente para alcanzar una densidad inicial de $2,0-2,5 \times 10^5$ células viables/ml. Se llevó a cabo la transferencia secuencial a biorreactores de siembra de mayor volumen (normalmente, biorreactores de siembra de 100 l a 300 l y después a los de 1.000 l, o biorreactores de siembra de 60 l a 235 l, 950 l, y 3750 l) después de aproximadamente dos días de cultivo en cada reactor y densidades celulares diana iniciales de $2,0-2,5 \times 10^5$ células viables/ml. El pH del cultivo se mantuvo por adición de gas de CO₂ o 1 M de carbonato sódico (Na₂CO₃) mediante un control automático. Las condiciones de funcionamiento diana de los biorreactores de siembra y producción incluyen un punto de temperatura fijado en 37 °C, pH 7,0 y un 30% de oxígeno disuelto (como porcentaje de la saturación de aire). Los biorreactores de 100 l, 300 l y 1.000 l se agitaron a 100 rpm, 80 rpm, y 70 rpm, respectivamente. En algunos casos, las condiciones diana de funcionamiento de los biorreactores de siembra y producción incluyen un punto de temperatura fijado en 37 °C, un pH de 7,0 con CO₂ rociado y control de adición básica y un 30% de oxígeno disuelto (como un porcentaje de saturación del aire). Los 25 30 biorreactores de mayor volumen se pueden agitar a velocidades de 100 rpm, 80 rpm, 70 rpm o 40 rpm.

6.2.2. Biorreactor de producción de cultivo celular

35 Después de aproximadamente 2 días en el biorreactor de siembra de 1.000 l, el inóculo se transfirió a un contenedor de acero inoxidable del biorreactor de producción con agitado. El biorreactor de producción tenía un volumen de trabajo de aproximadamente 10.000 l. Antes de su uso, el biorreactor se lavó en el sitio, se vaporizó en el sitio, y se cargó con aproximadamente 4.000 l de medio de control PFBM-2 o con el medio alto en glicina. Las sondas de pH y oxígeno disuelto se calibraron antes de que el biorreactor se vaporizara en el sitio.

40 En otro ejemplo, el inóculo se cultivó en un biorreactor de siembra de 3750 l antes de transferirlo a un contenedor de acero inoxidable del biorreactor de producción con agitado con un volumen de trabajo de aproximadamente 15.000 l, que se limpia en el sitio, se vaporiza en el sitio, y se cargó con aproximadamente 4.000-7.000 l de medio PFBM-2 o el medio alto en glicina antes de su uso.

45 La densidad de siembra diana del biorreactor de producción estaba en el intervalo de $2,0-2,5 \times 10^5$ células viables/ml. Se añadió un medio de alimentación libre de proteína concentrado definido químicamente (PFFM-3) (un medio de alimentación concentrado definido químicamente producido por reconstitución de los subcomponentes de PFFM-3 1 y 2, L-glutamina, D- glucosa, fosfato sódico dibásico heptahidrato, L-tirosina, ácido fólico, ácido clorhídrico, e hidróxido sódico) durante el cultivo. El PFFM3 contiene los componentes que se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9: Componentes del medio PFFM3

Componente	Concentración
Subcomponente 1 PFFM3 (aminoácidos)	20,4 g/L preparado
Subcomponente 2 PFFM3 (vitaminas y elementos traza)	4,93 g/L preparado
L-Glutamina	11,0 g/L preparado
D-Glucosa	28,0 g/L preparado
L-Tirosina, sal disódica	1,32 g/L preparado
Ácido Fólico	0,083 g/L preparado
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	1,74 g/L preparado
Hidróxido sódico	Varías, pH control
Ácido clorhídrico Glacial	Varías, pH control
Agua API	

El subcomponente 1 de PFFM3 contiene los componentes que se muestran en la Tabla 10 a continuación:

Tabla 10: PFFM3, Subcomponente 1			
Componentes del medio	PM (g/mol)	Conc. (mg/l)	Conc. (mM)
L-Arginina HCl	211,	1,900	9,00E+00
L-Asparagina Anhidra	132,1	1,320	9,99E+00
Ácido L-Aspártico	133,1	119	8,94E-01
L-Cisteína HCl•H ₂ O	176,0	2,030	1,15E+01
Ácido L-Glutámico	147,1	510	3,47E+00
Glicina	75,1	157	2,09E+00
L-Histidina HCl•H ₂ O	210,0	864	4,11E+00
L-Isoleucina	131,2	1,440	1,10E+01
L-Leucina	131,2	3,130	2,39E+01
L-Lisina HCl	183,0	2,160	1,18E+01
L-Metionina	149,2	1,260	8,45E+00
L-Fenilalanina	165,2	918	5,56E+00
L-Prolina	115,1	806	7,00E+00
L-Serina	105,1	709	6,75E+00
L-Treonina	119,1	1,220	1,02E+01
L-Triptófano	204,2	408	2,00E+00
L-Valina	117,1	1,450	1,24E+01

El subcomponente 2 de PFFM3 contiene los componentes que se muestran en la Tabla 11, a continuación:

5

Tabla 11: PFFM3, Subcomponente 2			
Componentes del medio	PM g/mol)	Conc. (mg/l)	Conc. (mM)
Vitamina B-12	1.355,0	10,72	7,91E-03
Biotina	244,0	0,156	6,39E-04
Cloruro de Colina	140,0	140	1,00E+00
I-Inositol	180,0	197	1,09E+00
Niacinamida	122,0	31,5	2,58E-01
Pantotenato cálcico	477,0	103,1	2,16E-01
Hidrocloreto de piridoxina	206,0	0,484	2,35E-03
Hidrocloreto de Tiamina	337,0	99,8	2,96E-01
Putrescina 2HCl	161,1	6,66	4,13E-02
Ácido DL-Lipoico tióctico	206,0	4,84	2,35E-02
Piruvato sódico	110,0	1,716	1,56E+01
Etanolamina HCl	97,54	76,1	7,80E-01
p-Mercaptoetanol	78,13	60,9	7,80E-01
Ácido Linoleico	280,48	0,655	2,34E-03
Pluronic F-68	8.350,0	780	9,34E-02
Cloruro potásico	74,55	432	5,79E+00
Riboflavina	376,0	3,42	9,09E-03
Cloruro magnésico anhid.	95,21	446	4,69E+00
Sulfato magnésico anhid.	120,4	762	6,33E+00
Selenito sódico	172,9	0,140	8,12E-04
Sulfato Cúprico •5H ₂ O	249,7	0,1069	4,28E-04
Sulfato Ferroso •7H ₂ O	278,0	6,51	2,34E-02
Nitrato potásico	101,1	0,593	5,86E-03
Sulfato de Zinc •7H ₂ O	287,5	15,0	5,23E-02
Sulfato de Manganeso, Monohidrato	169,01	0,00264	1,56E-05

Tabla 11: PFFM3, Subcomponente 2

Componentes del medio	PM g/mol)	Conc. (mg/l)	Conc. (mM)
Cloruro de níquel, 6-Hidrato	237,7	0,00186	7,81E-06
Cloruro de estaño 2H ₂ O	225,63	0,001130	5,01E-06
Molibdato amónico 4H ₂ O	1.235,86	0,00193	1,57E-06
Meta-vanadato amónico	116,98	0,00913	7,80E-05
Meta-silicato sódico 9H ₂ O	284,2	2,22	7,79E-03
EDTA, hierro (III), sal sódica	367,05	31,2	8,50E-02

El tiempo y cantidad de la adición del PFFM-3 al cultivo se produce como se muestra en la Tabla 12, a continuación:

Tabla 12: Calendario de alimentación ejemplar en un biorreactor DAC HYP

Día	Cantidad de PFFM-3 (% de la masa inicial)
0	0
1	0
2	4-4.14
3	7.8-8.08
4	7.8-8.08
5	7.8-8.08
6	11-11.38
7	13-13.46
8	15-15.52
9	15-15.52
10	0

El pH del cultivo se mantiene a aproximadamente un pH 7,0, preferentemente entre un pH 7,0 y pH 7,1, por el control automático de gas CO₂ y adición de carbonato sódico 1 M (Na₂CO₃). Se permite que el contenido de oxígeno disuelto caiga a aproximadamente un 30% de la saturación de aire. Se rocía una mezcla de oxígeno/aire en el cultivo para conseguir un flujo de gas total constante y se controla el oxígeno disuelto ajustando la relación de gases de aire respecto a oxígeno según se necesite por aumento de la velocidad de agitación después de alcanzar una relación máxima de oxígeno respecto a aire. En otro ejemplo, se ajusta el agitado para mantener una relación constante fuerza/volumen. Se añade una emulsión antiespumante basada en dimeticona al biorreactor basándose en base a las necesidades del nivel de espuma. Se toman muestras periódicamente para ensayar la densidad celular, viabilidad celular, concentración de producto, concentraciones de glucosa y lactato, O₂ disuelto, CO₂ disuelto, pH y osmolalidad. El cultivo del biorreactor se recolecta aproximadamente a los 10 días tras la inoculación. Antes de la recolección, los contenidos del biorreactor se muestran como volumen no procesado.

Se entenderá que las condiciones de alimentación y el calendario de alimentación se pueden ajustar para la producción del anticuerpo a un título optimizado. La osmolalidad del medio de cultivo se puede ajustar según se necesite para obtener el título óptimo. Adicionalmente, se pueden ajustar los niveles de glutamina y glucosa durante la fase de producción para mantener los títulos óptimos.

Recolección y retirada de las células

Justo antes de la recolección, el biorreactor de producción se enfría primero a < 15 °C, después se ajusta a un pH de 5,0 ± 0,1 utilizando ácido cítrico 0,5 M o 1 M o 2 M, y se mantiene durante un periodo de aproximadamente 30-90 o 45-60 minutos para que floculen las células y desechos celulares antes de transferirlo al matraz de recolección. La recolección con el pH ajustado se clarifica entonces por centrifugación continua funcionando en los parámetros predefinidos para velocidad del recipiente y se define el flujo como en la documentación de registro del lote.

El concentrado se filtra mediante un filtro profundo seguido por un filtro de membrana de 0,22 mm y se recolecta en un contenedor pre-esterilizado. La recolección libre de células se ajusta a un pH aproximado de 6,4 utilizando una solución Tris de 1-2 M y se almacenó a 2-8 °C para posteriores procesamientos. En algunos casos, este ajuste del pH se produce a las 12 horas del ajuste de pH en el biorreactor original a un pH de 5,0.

6.2.4. Purificación de anticuerpos

Los materiales de la recolección de las ejecuciones a escala piloto (50 litros y más) se purificaron basándose en tres técnicas de cromatografía (cromatografía de afinidad con Proteína A Mabselect, cromatografía de intercambio aniónico Q-Sepharose, y cromatografía de intercambio catiónico CM-Sepharose) en combinación con una etapa de inactivación vírica a bajo pH, una etapa de filtración vírica, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, una etapa de formulación. Los materiales de la recolección de 2 litros se procesaron mediante una columna de Proteína A seguido por cromatografía de exclusión por tamaño.

6.3. Determinación del perfil de glicosilación

6.3.1. Materiales y métodos

Los anticuerpos purificados de diferentes condiciones de cultivo (condición de control con baja glicina vs. condición experimental con glicina alta) se caracterizaron analíticamente. Se utilizó el mapeo peptídico para cuantificar las diferentes glicoformas en los productos de anticuerpo. El anticuerpo se redujo primero con ditiotretol, se alquiló con ácido yodoacético, y luego se digirió con tripsina, y finalmente se analizó por RP-HPLC con detección por MS. Se obtuvieron las áreas del pico de cada glicoforma y el porcentaje relativo de cada glicoforma se calculó entonces de las áreas del pico totales.

6.3.2. Resultados

Los porcentajes relativos de cada glicoforma presente en los cinco anticuerpos diferentes producidos por las células NS0 cultivadas con el medio básico de control que contenía 2 mM de glicina o el medio básico suplementado con 15 mM (con una concentración total de 17 mM) se representan en la Tabla 13. El aumento de porcentaje de las dos glicoformas no fucosiladas para los cinco anticuerpos diferentes, glicoforma G0-GlcNAc-Fucosa y la glicoforma 5Man, formadas en el medio suplementado con glicina con respecto al medio de control se muestran en la FIGURA 2 y la FIGURA 3. El aumento del porcentaje total combinado de anticuerpos no fucosilados con respecto al control se muestra en la FIGURA 4. Los datos indican que los anticuerpos de células cultivadas en una alta concentración de glicina presentan niveles más altos de glicoformas no fucosiladas que los mismos anticuerpos del procedimiento de control con una baja concentración de glicina. Con respecto a la glicoforma G0-GlcNAc-Fucosa, cuatro de los cinco anticuerpos de las células cultivadas en el medio de cultivo con concentración más alta de glicina presentaban de un 150% a casi el 300% de esta glicoforma con respecto al control. Con respecto a la glicoforma 5Man, el intervalo de cuatro de los cinco anticuerpos era del 150% a > 200% de aumento de esta glicoforma con respecto al control. Mirando colectivamente la cantidad total de anticuerpos no fucosilados, los cinco anticuerpos presentaban un aumento de 1,5-2,5 veces cuando las células se cultivaban en el medio con concentración más alta de glicina.

Tabla 13: Perfil de glicosilación de cuatro anticuerpos producidos por métodos de acuerdo con la presente divulgación

TABLA 13						
Elotuzumab	G0-GlcNAc-Fucosa	5Man	Total de Ab no fucosilados	G0-GlcNAc	G0	G1
1k l control	1,6	2,0	3,6	13,3	68,9	14,2
100 l con glicina extra	2,7	4,4	7,1	13,3	70,2	9,4
PDL241						
2 l control	4,9	7,4	12,3	20,6	58,0	9,1
2 l con glicina extra	6,0	11,8	17,7	20,7	56,6	5,0
PDL192						
1k l control	1,8	2,1	3,9	9,7	76,7	9,7
50 l con glicina extra	4,2	4,4	8,6	11,6	75,2	4,5
Daclizumab						
2 l control	1,4	1,0	2,4	7,7	72,5	17,4
2 l con glicina extra	4	1,9	5,9	14,6	69,3	10,2
M200						

TABLA 13						
Elotuzumab	G0-GlcNAc-Fucosa	5Man	Total de Ab no fucosilados	G0-GlcNAc	G0	G1
2 l control	0,4	0,4	0,8	4,3	66,1	28,8
2 l con glicina extra	0,7	0,5	1,2	5,7	80,2	12,9

En el estudio de respuesta a la dosis, los porcentajes de cada glicoforma presente en el anticuerpo PDL192 (enavatuzumab) producido por las células cultivadas en el medio básico de control que contenía 2 mM de glicina o el medio básico suplementado con diferentes concentraciones de glicina (7, 17, y 32 mM) se presentan en la Tabla 14. El aumento de porcentaje de las dos glicoformas no fucosiladas del PDL192, glicoforma G0-GlcNAc-Fucosa y glicoforma 5Man, que se formaban en el medio suplementado con glicina con respecto al medio de control se muestran en la **FIGURA 5**. Los datos indican que el PDL192 producido en condiciones con glicina extra presenta un nivel más alto de glicoformas no fucosiladas que el anticuerpo producido por el procedimiento de control. Más específicamente, para glicoforma G0-GlcNAc-Fucosa no fucosilada, la cantidad de la glicoforma aumenta al aumentar la concentración de glicina en el medio de cultivo de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de aumento variaba de 120% a > 160% respecto al control según aumentaba la concentración de glicina de 7 a 32 mM.

Tabla 14: Perfil de glicosilación y unión a CD16a del PDL192 producido en medios de cultivo con exceso de glicina

TABLE 14							
PDL192	G0-GlcNAc-Fucosa	5Man	Total de Ab no fucosilados	G0-GlcNAc	G0	G1	Unión a CD16a respecto a la referencia
2 l control	2,1	5,2	7,3	12,3	70,6	9,8	130
2 l con 5 mM de glicina extra	2,6	6,3	8,9	15,4	71,3	4,4	146
2 l con 15 mM de glicina extra	3,3	7,7	11,0	13,5	70,5	4,9	151
2 l con 30 mM de glicina extra	3,5	6,3	9,8	14,6	71,5	4,0	144

6.4. Ensayo de unión a CD16a

6.4.1. Materiales y métodos

Se llevó a cabo un ensayo de unión a CD16a utilizando el método AlphaScreen (Perkin Elmer) para evaluar la potencia de unión de la región Fc de anticuerpo de cuatro anticuerpos diferentes contra el receptor CD16a humano. La solución de anticuerpos se mezcló primero con una solución de CD16a recombinante humano y un tampón de ensayo, y después se añadieron las perlas Alphascreen donantes y las perlas de anticuerpo receptoras. La mezcla se incubó en una localización protegida de la luz durante 4 horas a temperatura ambiente y se detectó la señal fluorescente utilizando un lector de placas con excitación láser a 680 nm y emisión de luz a 520-620 nm. Se registró la potencia de unión con respecto al anticuerpo de referencia cultivado en un medio básico sin exceso de glicina.

6.4.2. Resultados

Los resultados de los ensayos de potencia de CD16a para cuatro anticuerpos IgG1 diferentes (elotuzumab, daclizumab, PDL192 y PDL241) se muestran en la Tabla 15. Los cuatro anticuerpos IgG1 de las células cultivadas en la alta concentración de glicina mostraba consistentemente más de un 40% de aumento en la afinidad de unión para el receptor CD16a humano, y en el caso más extremo presentaba un aumento de dos veces en términos de potencia de unión con respecto a los anticuerpos de control producidos en el medio básico sin exceso de glicina (es decir, el medio de cultivo con 2 mM de glicina). La FIGURA 6 muestra la potencia de unión relativa al receptor CD16a para los cuatro anticuerpos IgG1. La cantidad se expresa como el porcentaje respecto a las afinidades de unión a CD16a de los mismos anticuerpos producidos por las células NS0 cultivados en medio básico de control sin

suplementación adicional de glicina.

Tabla 15: Unión a CD16a de cuatro anticuerpos producidos por métodos de acuerdo con la presente divulgación

TABLA 15	
Elotuzumab	Unión a CD16a respecto a la referencia
1k l control	100%
100 l con glicina extra	128%
1k l con glicina extra	146%
PDL241	
2 l control	147%
2 l con glicina extra	277%
250 l control	100%
100 l con glicina extra	137%
PDL192	
1k l control (GMP)	65%
1k l control	96%
100 l control	110%
58 l con glicina extra	136%
Daclizumab	
2 l control	69%
2 l con glicina extra	137%

Los resultados de la potencia de CD16a del estudio de respuesta a la dosis de PDL192 se muestran en la Tabla 14 y la FIGURA 7. El PDL192 de las células cultivadas en condiciones suplementadas con glicina extra de 5, 15 y 30 mM presentaban una mayor afinidad de unión a CD16a que el anticuerpo del procedimiento de control, aunque no se observó un aumento de la unión a CD16a dependiente de la dosis.

6.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

6.5.1. Materiales y método

Se analizó la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos expresados. Las células diana se marcaron primero con ^{51}Cr y se prepararon las células efectoras (células mononucleares de sangre periférica humanas, PBMC) a partir de sangre completa. Las células y la solución de anticuerpo se incubaron entonces a 37 °C durante 4 horas. La radioactividad de los sobrenadantes se midió en cuanto a la liberación experimental (E), liberación espontánea (S, liberación de la diana sin células ni anticuerpo), y el lisado total (T, liberación de las células diana tratadas con detergente 1% de Triton X-100). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad como $[(E-S)/(T-S)] \times 100$.

6.5.2. Resultados

Los resultados de los ensayos de la ADCC de cuatro anticuerpos diferentes (elotuzumab, PDL241, PDL192 y daclizumab) se muestran en las FIGURAS 8A-C, 10A-B y 11A-B, con cada ensayo llevado a cabo en PBMC de dos o tres donantes diferentes. En las cuatro figuras, los anticuerpos de las células cultivadas con la concentración más alta de glicina aumentaban la actividad ADCC en comparación con los mismos anticuerpos de las células cultivadas en el procedimiento de control. Los resultados indican que la actividad ADCC es consistente con la potencia de unión a CD16a, y los resultados de ambos ensayos se correlacionan con los patrones de glicosilación de los anticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

<130> 381493-735WO (118134)

<140>

<141>

<150> 61/708.554

<151> 01-10-2012

<160> 21

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2

30

ES 2 646 594 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

ES 2 646 594 T3

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

ES 2 646 594 T3

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Glu Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

ES 2 646 594 T3

Val Gly Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

ES 2 646 594 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
100 105

<210> 7
 <211> 442
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> Fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

 <400> 7

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

 Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

 Thr Val Ser Ser Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

ES 2 646 594 T3

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
		195					200					205					
Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
	210					215					220						
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
225					230					235					240		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
				245					250					255			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
			260					265					270				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
		275					280					285					
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
	290					295					300						
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
305					310					315					320		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
				325					330					335			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
			340					345					350				
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
		355					360					365					
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
		370				375					380						
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
385					390					395					400		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
				405				410						415			
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
			420					425					430				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
			435					440									

5 <210> 8
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 8

ES 2 646 594 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg
210

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

ES 2 646 594 T3

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

10 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

20 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

ES 2 646 594 T3

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Asn Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp
100 105 110

ES 2 646 594 T3

Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
	130					135					140				
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
	210					215					220				
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	275						280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345				350			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser

ES 2 646 594 T3

355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Leu Gly Lys		
450		

<210> 12

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

ES 2 646 594 T3

Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	20	25	30	
Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Asn	Leu	Trp	35	40	45	
Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	65	70	75	80
Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Leu	Arg	Ser	Pro	85	90	95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	100	105	110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	115	120	125	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	130	135	140	
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	145	150	155	160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	165	170	175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	180	185	190	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	195	200	205	
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210	215											

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 646 594 T3

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

ES 2 646 594 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 646 594 T3

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	20	25	30
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45
Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	50	55	60
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Ser	Thr	Met	Ile	Ala	Thr	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu			

ES 2 646 594 T3

	260		265		270										
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
	275						280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
290						295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
	355						360					365			
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
370						375					380				
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385					390					395					400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405					410					415	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His
			420				425						430		
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
	435						440					445			
Gly	Lys														
	450														

<210> 16

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

ES 2 646 594 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 646 594 T3

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético "

5 <400> 17

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
          50           55           60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85           90           95

Tyr Cys Thr Gly Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 18

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 18

ES 2 646 594 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 19

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

ES 2 646 594 T3

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

ES 2 646 594 T3

				165						170					175				
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser				
			180					185					190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro				
		195					200					205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys				
	210					215					220								
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				245					250					255					
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
			260					265					270						
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
		275					280					285							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
	290					295					300								
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
305					310					315					320				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys				
				325					330					335					
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
			340					345					350						
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
		355					360					365							
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
	370					375					380								
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
385					390					395					400				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
				405					410					415					

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

ES 2 646 594 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un anticuerpo IgG1, que comprende:
 - 5 cultivar células NS0 modificadas para que secreten y expresen el anticuerpo IgG1 en un medio de cultivo celular que comprende glicina a una concentración entre 5 mM y 30 mM en condiciones adecuadas para la expresión y secreción del anticuerpo IgG1, produciéndose de esta manera el anticuerpo IgG1.
 2. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glicina está en el intervalo de desde 10 mM a 25 mM,
10 o 15 mM a 20 mM, o 16 mM a 18 mM.
 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el medio es un medio libre de proteína.
 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente la recuperación del
15 anticuerpo IgG1.
 5. El método de la reivindicación 4, donde la recuperación del anticuerpo IgG1 comprende la etapa de separar las células NS0 del medio de cultivo, y opcionalmente purificar el anticuerpo IgG1.
 - 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las células NS0 se siembran a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ml a $2,5 \times 10^5$ células/ml, antes de dicho cultivo.
 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo IgG1 comprende una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
25 opcionalmente donde el anticuerpo IgG1 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 4.
 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo IgG1 comprende una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
30
 9. El método de la reivindicación 8, donde el anticuerpo IgG1 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 8.
 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo IgG1 comprende una región VH de
35 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
 11. El método de la reivindicación 10, donde el anticuerpo IgG1 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 12.
 - 40 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo IgG1 comprende una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.
 13. El método de la reivindicación 12, donde el anticuerpo IgG1 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 16.
45
 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo IgG1 comprende una región VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una región VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.
 - 50 15. El método de la reivindicación 14, donde el anticuerpo IgG1 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa de SEQ ID NO: 20.

Estructuras de glucanos unidos a N típicos

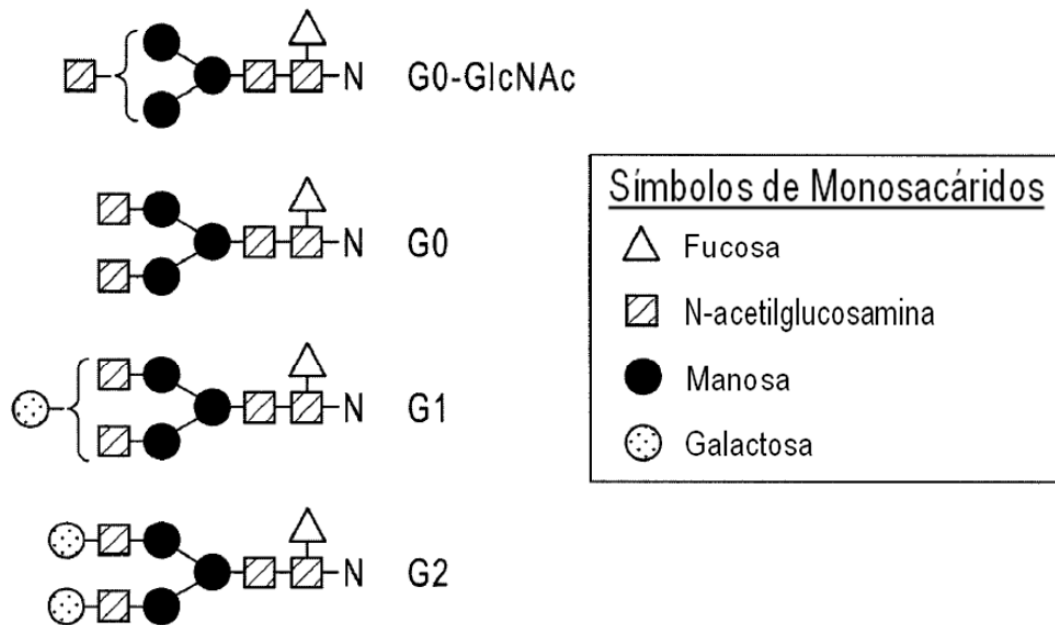


FIGURA 1

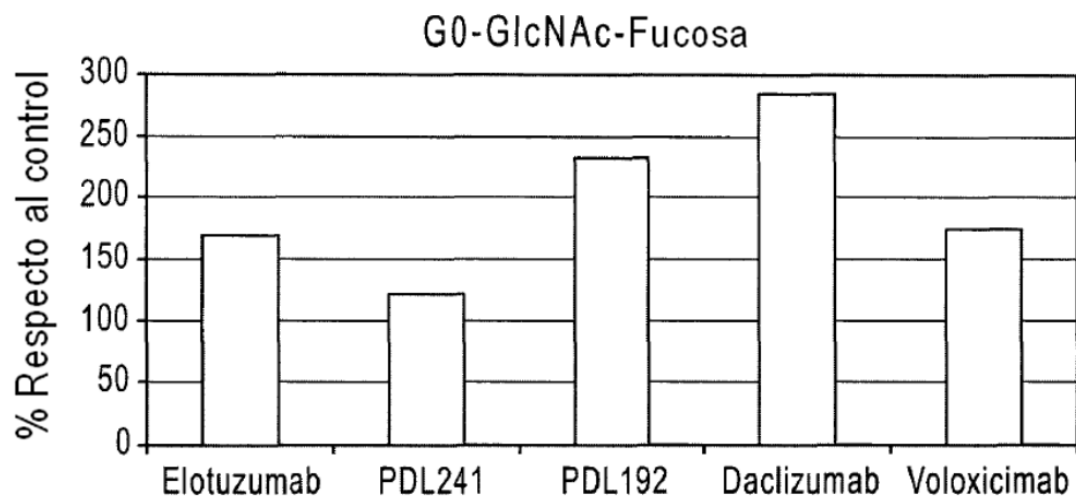


FIGURA 2

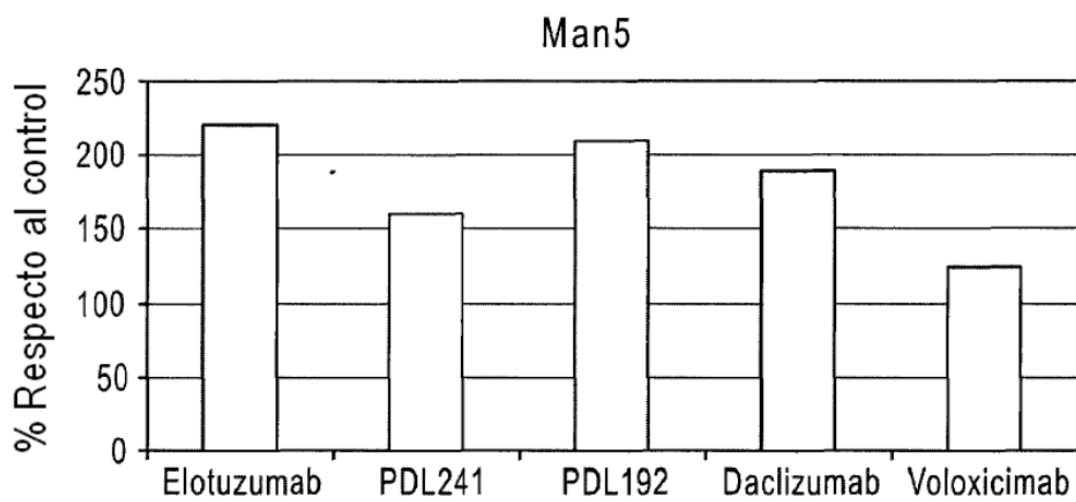


FIGURA 3

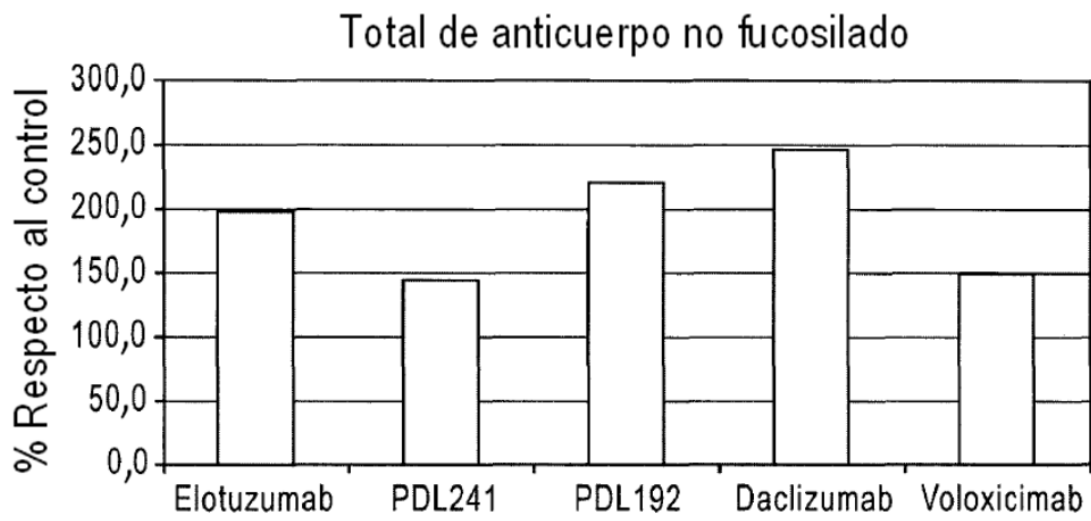


FIGURA 4

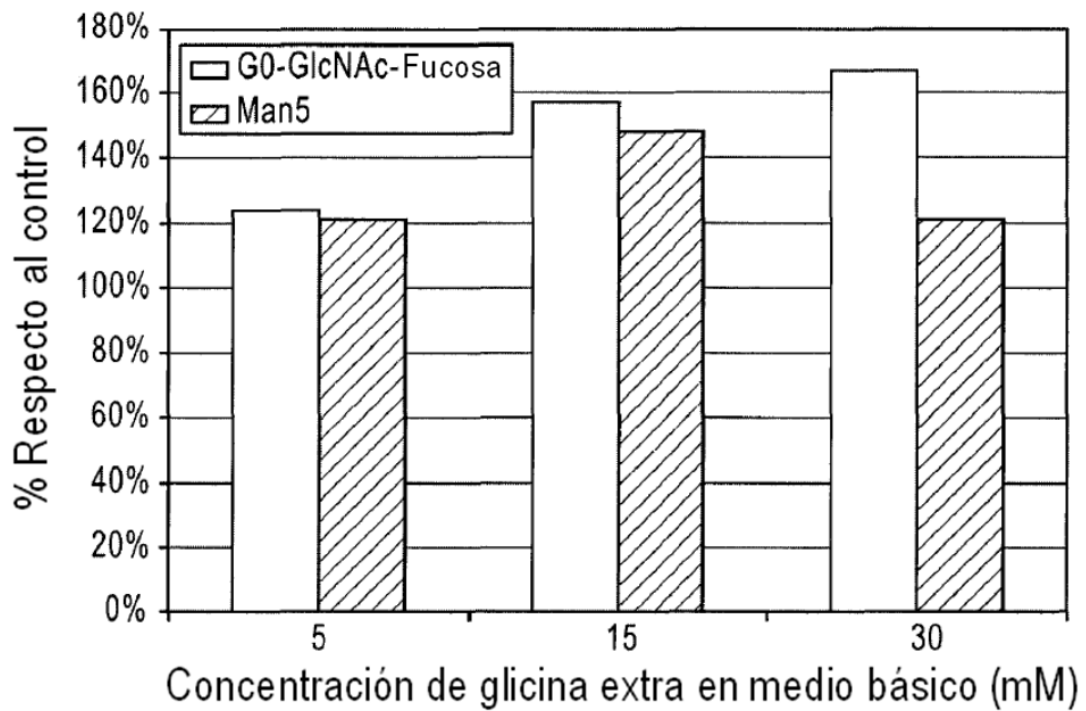


FIGURA 5

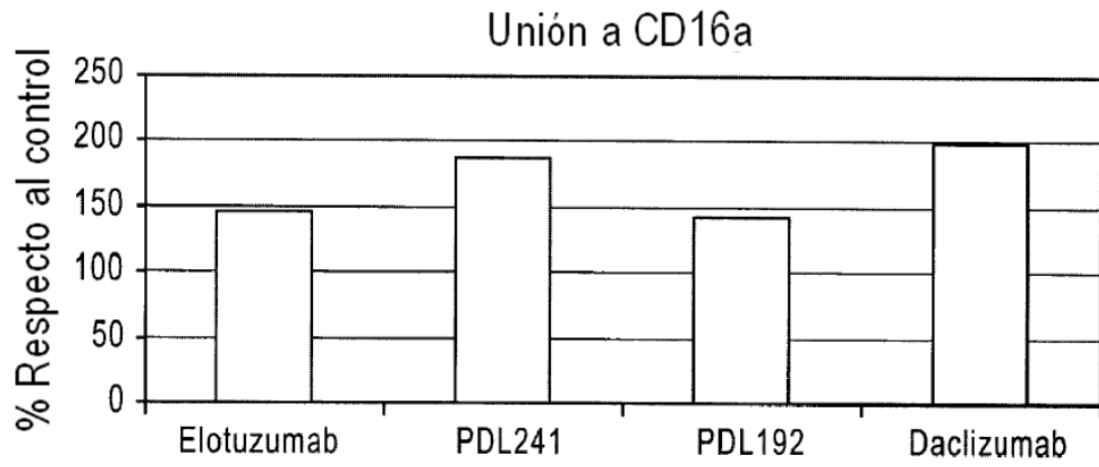


FIGURA 6

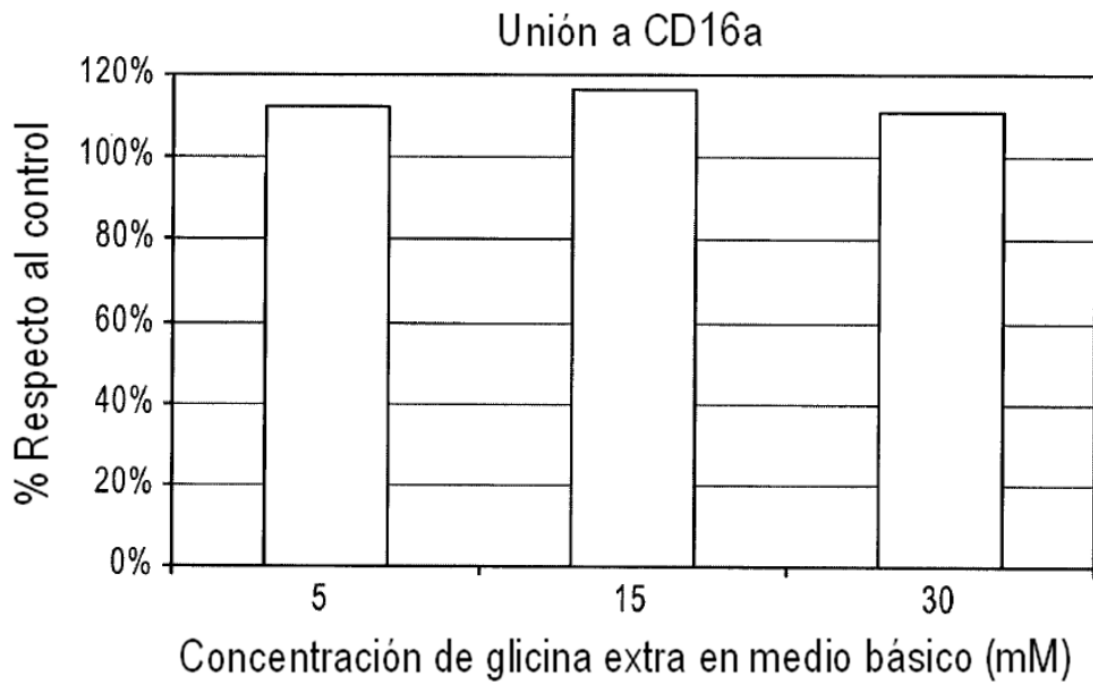


FIGURA 7

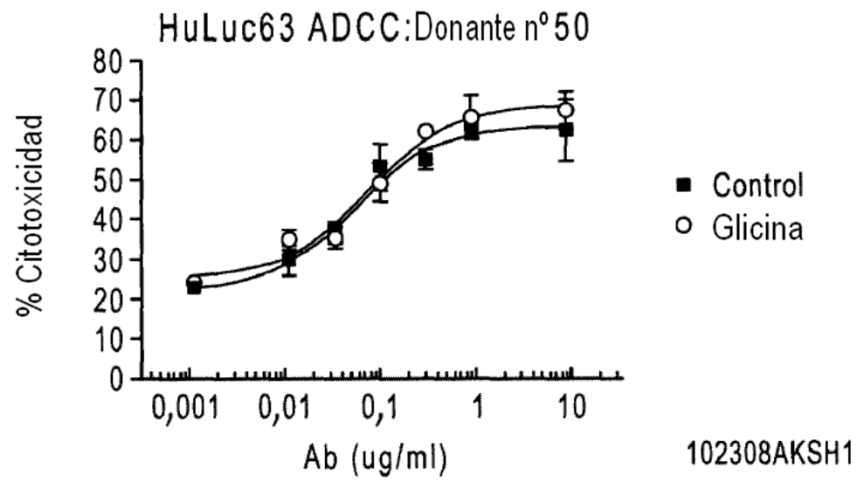


FIGURA 8A

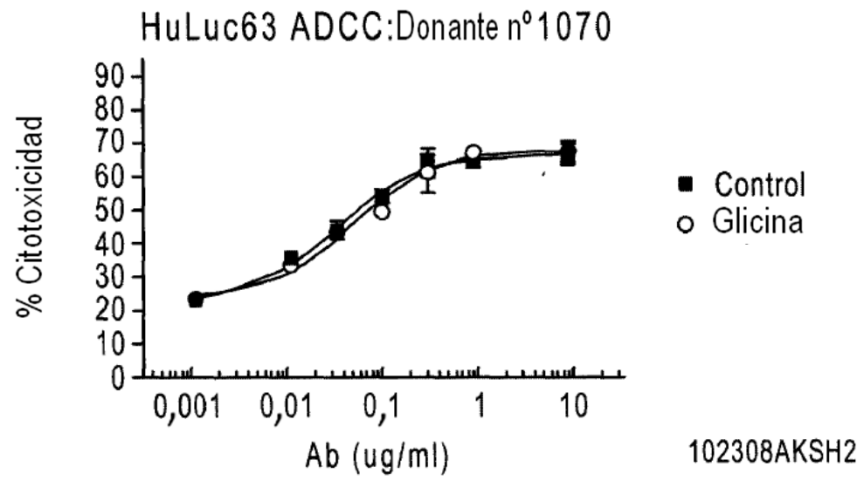


FIGURA 8B

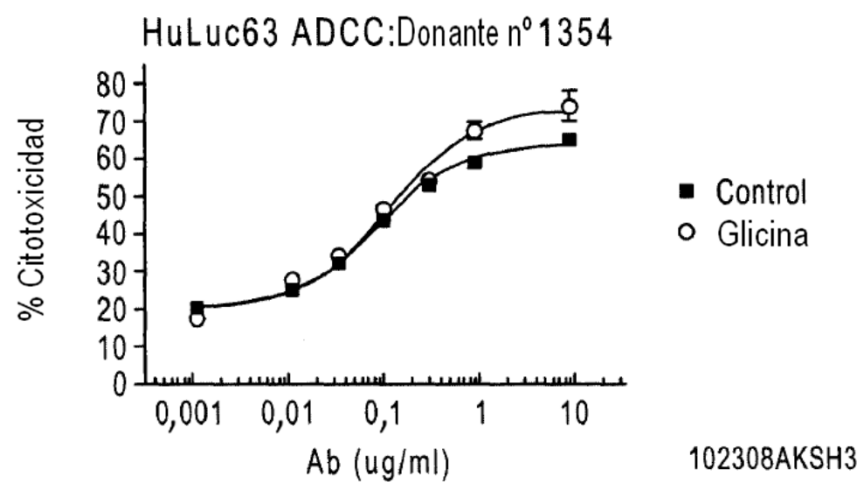


FIGURA 8C

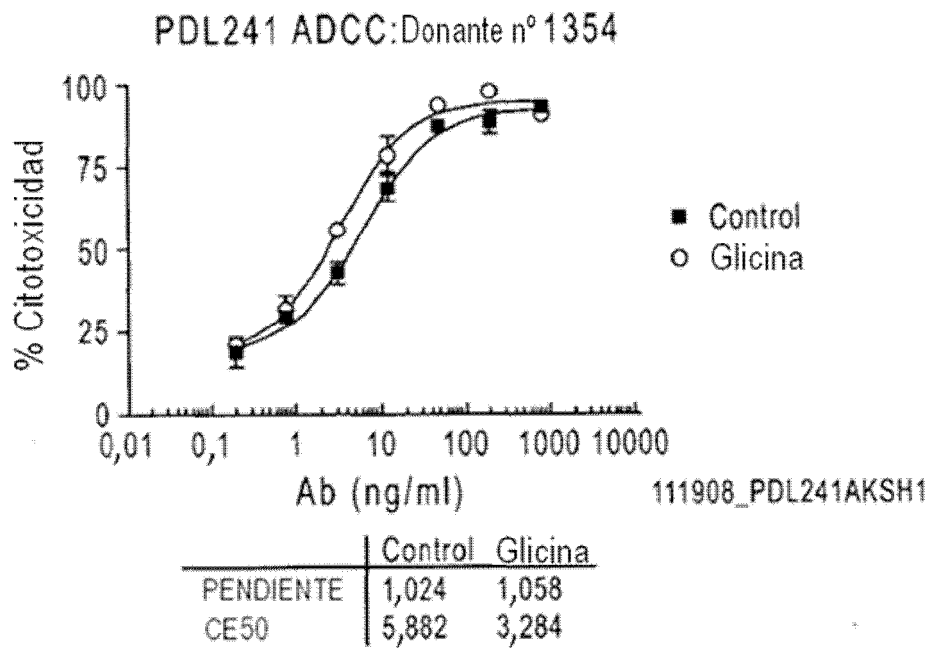


FIGURA 9A

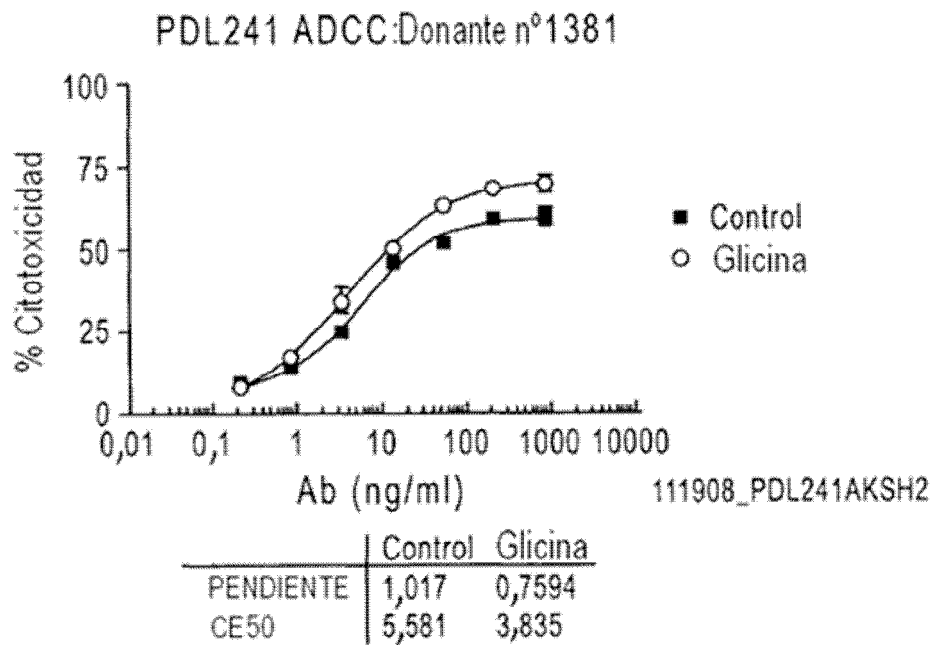


FIGURA 9B

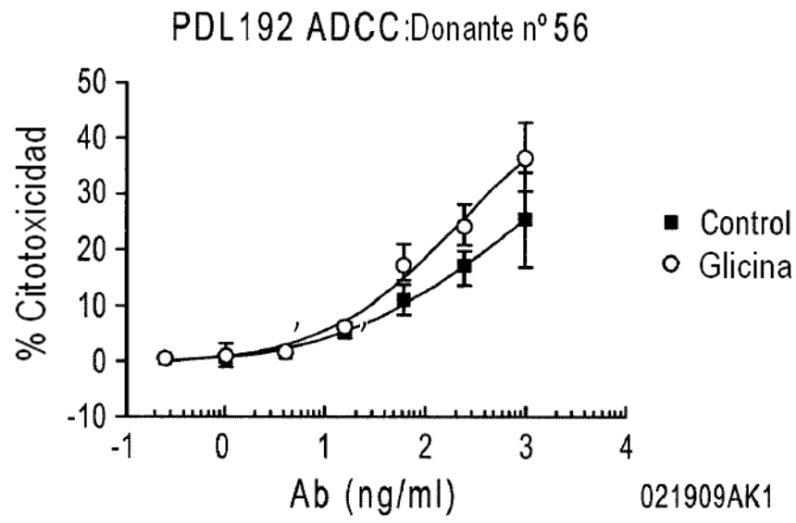


FIGURA 10A

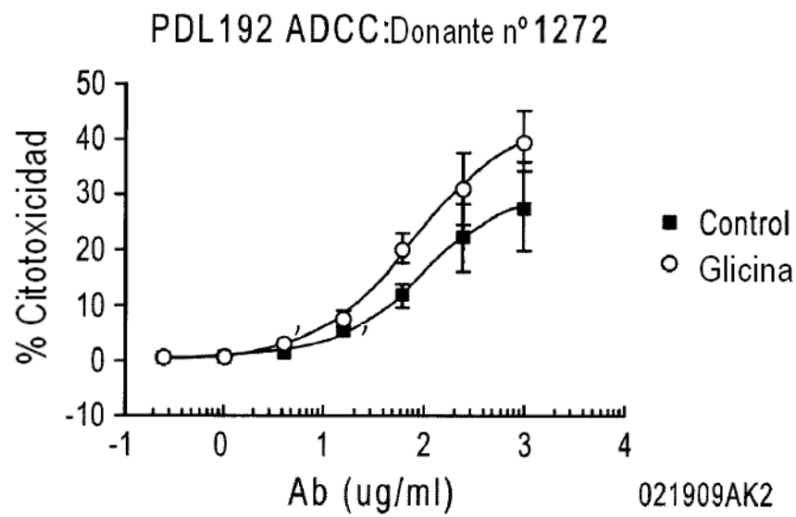


FIGURA 10B

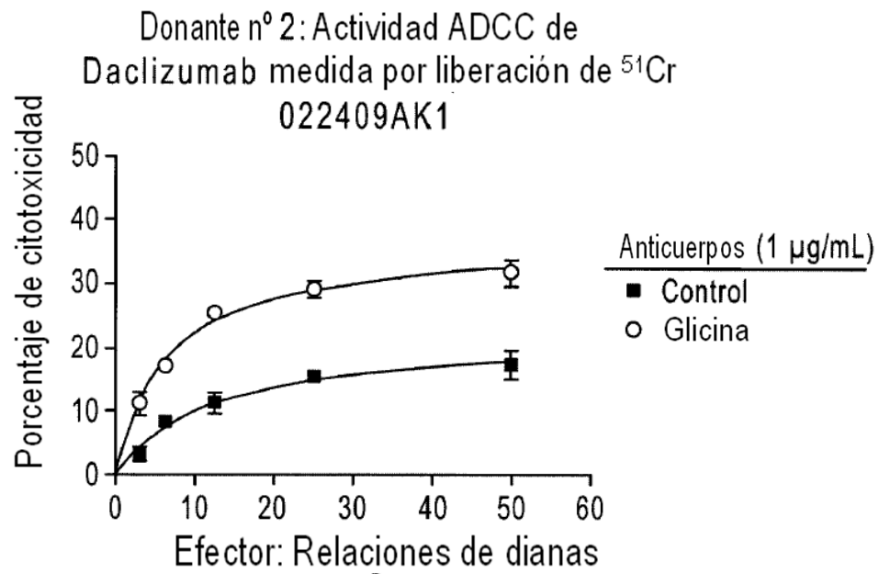


FIGURA 11A

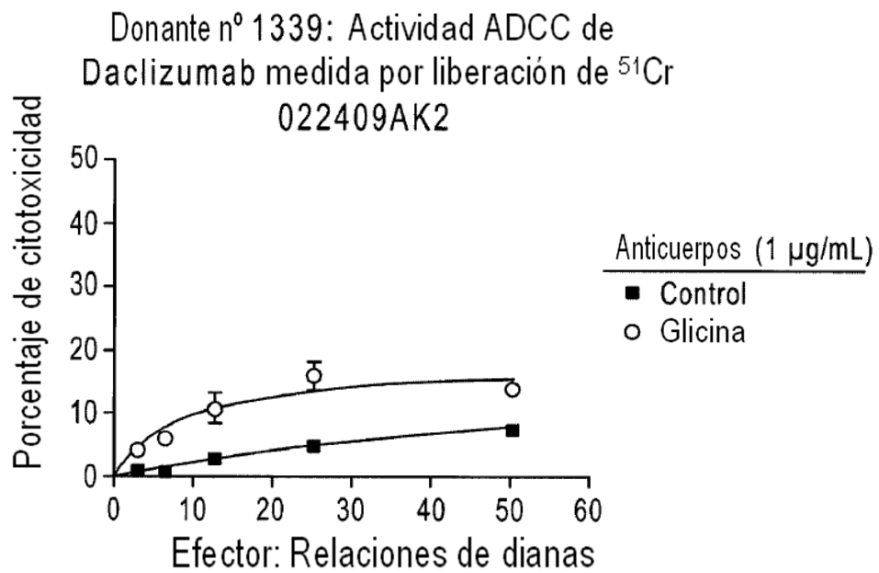


FIGURA 11B