

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 074**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2010 E 14179885 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2808393**

54 Título: **Células deficientes de fucosilación**

30 Prioridad:

**02.06.2009 US 183400**  
**27.05.2010 US 348858 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, GANG;**  
**BURAKOV, DARYA y**  
**FANDL, JAMES, P.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 661 074 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Células deficientes de fucosilación

## 5 Campo de la invención

10 La invención se refiere a una enzima de mamífero modificada en la vía de fucosilación, en donde las células que portan la enzima de mamífero modificada muestran una capacidad reducida para fucosilar una proteína, y a las células que comprenden una modificación genética que da como resultado una capacidad reducida para fucosilar una proteína. La invención incluye líneas celulares de mamífero (por ejemplo, líneas CHO) que expresan proteínas, que incluyen anticuerpos, con reducción de la fucosilación en comparación con las líneas celulares de tipo silvestre. La invención se refiere, además, a un control condicional de la fucosilación de proteínas.

## 15 Antecedentes de la invención

En la técnica se conocen líneas celulares que no son capaces de fucosilar proteínas. Se conocen una serie de mutantes con pérdida de función que no son capaces de fucosilar proteínas, quizás las más notables son algunas células mutantes de ovario de hámster chino (CHO) seleccionadas por su resistencia a determinadas lectinas. Dichas líneas celulares se aíslan mediante selección repetida por la incapacidad de unirse a una lectina particular, por ejemplo, la lectina de *Lens culinaris*, en presencia de un mutágeno. Se conocen otras líneas celulares que se han reportado como incapaces de fucosilar proteínas, por ejemplo, anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,425,466 y la patente de Estados Unidos núm. 7,214,775 ( $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa, es decir, mutante de FUT8). EP-A1-1,331,266 se refiere a células productoras de composiciones de anticuerpos. En la técnica persiste la necesidad de líneas celulares con una capacidad reducida para fucosilar proteínas, en particular de células con reducción de la capacidad de fucosilación en ausencia de una inactivación, y de células que fucosilan proteínas condicionalmente.

## Resumen

30 En un aspecto, se proporciona una célula que expresa una proteína GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5- epimerasa-4-reductasa (FX) con una modificación, en donde la modificación de la proteína FX comprende la sustitución de aminoácidos 289S y al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en las siguientes sustituciones de aminoácidos: 90K, 211R, 136L, y 79S, en donde la célula expresa, además, una glicoproteína y en donde la modificación de la proteína FX da como resultado al menos un 90 % de reducción en la capacidad de la célula para fucosilar la glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación.

Se describe, además, un ácido nucleico que codifica una secuencia de la proteína FX modificada. En un caso específico, el ácido nucleico es un ADNc. Se describe, además, un vector de expresión o un vector transformante que comprende el ácido nucleico. En un caso, el ácido nucleico del vector transformante comprende un intrón. En un caso, el ácido nucleico del vector transformante comprende un ADNc que codifica la proteína FX modificada. En un caso específico, el vector transformante comprende una secuencia de direccionamiento que dirige al vector a un locus en un genoma humano, de primate no humano, de hámster, de ratón, o de rata.

45 La célula proporcionada que comprende la proteína o ácido nucleico de FX modificados, expresa una glicoproteína que contiene Fc, en donde la célula fucosila no más del 90 %, no más del 95 %, no más del 96 %, no más del 97 %, no más del 98 %, o no más del 99 % de la glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación.

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

55 En una modalidad, la primera temperatura es aproximadamente 37 °C. En una modalidad, la segunda temperatura es aproximadamente 34 °C.

En una modalidad, la capacidad para fucosilar la glicoproteína a la primera temperatura es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % de la capacidad para fucosilar la glicoproteína que muestra una célula que carece de la modificación. En una modalidad, la capacidad para fucosilar la glicoproteína a la segunda temperatura es de aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, o más en comparación con la capacidad para fucosilar la glicoproteína que muestra una célula que carece de la modificación.

60 En una modalidad específica, la modificación de la proteína FX comprende la sustitución de aminoácidos 289S y al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en las siguientes sustituciones de aminoácidos: 90K, 211R, 136L y 79S, y una combinación de estas.

- 5 En una modalidad, la proteína FX es de un primate no humano (por ejemplo, *Macaca mulatta*), un ser humano, un ratón (por ejemplo, *Mus musculus*), una rata (por ejemplo, *Rattus norvegicus*), o un hámster (por ejemplo, hámster chino, o *Cricetulus griseus*). En una modalidad específica, la proteína FX comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:3, sec. con núm. de ident.:4, sec. con núm. de ident.:5, o sec. con núm. de ident.:6, y porta una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) como se describe en la presente.
- 10 En una modalidad, el ácido nucleico codifica una proteína FX que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de sec. con núm. de ident.:1, y comprende además la sustitución de aminoácidos 289S y uno o más de los siguientes aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones: 79S, 90K, 136L, y 211R.
- 15 En una modalidad, el ácido nucleico codifica una FX que es al menos 95 % idéntica a la FX de sec. con núm. de ident.:2. En una modalidad específica, la FX tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2.
- 20 En una modalidad, la célula expresa una enzima de la vía de fucosilación de tipo silvestre seleccionada del grupo que consiste en GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), una GDP-β-L-fucosa pirofosforilasa de tipo silvestre (GFPP), una α-1,6-fucosiltransferasa de tipo silvestre (FUT8), y una combinación de estas.
- 25 En un aspecto, la célula es una célula de mamífero capaz de fucosilar una proteína, en donde la célula comprende una modificación en un gen de FX, en donde la modificación da como resultado al menos un 90 % de reducción en la capacidad de la célula para fucosilar una proteína en comparación con una célula que carece de la mutación o alteración.
- 30 En una modalidad, la reducción es de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % en comparación con una célula de mamífero que no contiene la modificación.
- 35 En una modalidad, la comparación de una célula modificada de acuerdo con la invención y una célula que no comprende la modificación se realiza en las mismas o esencialmente las mismas condiciones (por ejemplo, medios, temperatura, densidad celular, etcétera).
- En una modalidad, la célula se selecciona de una célula COS, CHO, 293, BHK, HeLa, Vero, un mamífero transfectado con genes de adenovirus, por ejemplo, AD5 E1, que incluye pero sin limitarse a una célula de retina humana inmortalizada transfectada con un gen de adenovirus, por ejemplo, una célula PER.C6™, y una célula NSO. En una modalidad, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una modalidad específica, la célula CHO es una célula CHO K1.
- La sustitución comprende 289S y uno o más de 79S, 90K, 136L, y 211R.
- 40 En una modalidad, la célula comprende un gen de FX que codifica una proteína que comprende la secuencia de sec. con núm. de ident.:1, con la sustitución de aminoácidos L289S y una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N79S, N90K, P136L y G211R, y una combinación de estas. Por lo tanto la sustitución de aminoácidos comprende L289S y una o más de N79S, N90K, P136L, y G211R.
- 45 En una modalidad, la célula comprende además al menos un ácido nucleico que codifica una proteína inmunoglobulínica. En una modalidad específica, la proteína inmunoglobulínica es una proteína humana o una proteína de ratón. En una modalidad específica, la proteína inmunoglobulínica comprende una cadena ligera de inmunoglobulina. En una modalidad específica, la proteína inmunoglobulínica comprende una cadena pesada de inmunoglobulina. En una modalidad, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En una modalidad, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, por ejemplo, un isotipo IgG1 humano. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada y/o ligera comprende una CDR humana, en otra modalidad una CDR de ratón, en otra modalidad una CDR humanizada de un ratón o un primate no humano.
- 50 En una modalidad, la célula comprende un ácido nucleico que codifica un dominio CH2 y uno CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una modalidad, la cadena pesada de inmunoglobulina es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.
- 55 En una modalidad, la proteína es una proteína de unión a antígenos. En una modalidad específica, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo. En modalidades específicas, el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En una modalidad, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo de isotipo IgG1.
- 60 En una modalidad, la proteína es un anticuerpo y solo se fucosila aproximadamente el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o 0,5 % del anticuerpo proteico producido por la célula. En una modalidad, la cantidad de anticuerpo proteico producido que está fucosilado se mide mediante desglucosilación del anticuerpo proteico durante la noche con PNGasa F seguido por análisis de oligosacáridos por medio de HPLC, en donde los oligosacáridos que contienen fucosil se cuantifican mediante la integración del área del pico de glicano, y, por ejemplo, la fucosilación de proteínas
- 65

se calcula basado en el área del pico de glicano. En una modalidad específica, los glicanos fucosilados se identifican mediante espectroscopía de masa.

5 En un aspecto, se proporciona un método para producir una proteína de unión a antígenos, el método comprende: (a) proporcionar una célula de la invención; (b) introducir en la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígenos; (c) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar la secuencia de ácido nucleico para producir la proteína de unión a antígenos; y, (d) recuperar la proteína de unión a antígenos expresada por la célula.

10 En una modalidad, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo. En una modalidad específica, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico de humano/ratón, y un anticuerpo de primate no humano.

15 En una modalidad, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En una modalidad, la reducción en la capacidad de la célula para fucosilar una proteína es de 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % en comparación con una célula que carece de la modificación en el gen de FX.

20 La modificación comprende 289S y al menos uno de 79S, 90K, 136L, y 211R.

En una modalidad, el gen de fucosiltransferasa codifica una proteína que comprende la secuencia de sec. con núm. de ident.:1, con la sustitución de aminoácidos L289S y al menos una de N79S, N90K, P136L, y G211R.

25 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de este es un anticuerpo humano o fragmento de este. En una modalidad específica, el anticuerpo es de un isotipo IgG1, por ejemplo, una IgG1 humana.

30 En una modalidad, el anticuerpo recuperado tiene no más de aproximadamente el 5 % de fucosilación en comparación con el mismo anticuerpo producido en una célula de tipo silvestre que carece de la modificación, en otra modalidad, no más del 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o 0,5 % de fucosilación en comparación con el mismo anticuerpo producido en una célula de tipo silvestre que carece de la modificación.

35 En un aspecto, la célula proporcionada expresa una enzima de la vía de fucosilación de tipo silvestre seleccionada del grupo que consiste en GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), una GDP-β-L-fucosa pirofosforilasa de tipo silvestre (GFPP), una α-1,6-fucosiltransferasa de tipo silvestre (FUT8), y una combinación de estas; en donde la célula comprende un gen de FX modificado, en donde la célula tiene una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación en el gen de FX.

40 En una modalidad específica, la glicoproteína comprende un Fc. En una modalidad, la proteína es un anticuerpo. En una modalidad, la proteína comprende una secuencia de una IgG. En una modalidad específica, la secuencia de una IgG es una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o una combinación de estas. En una modalidad específica, la proteína es un anticuerpo y el anticuerpo comprende un Fc que tiene una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3, y/o IgG4.

45 En una modalidad, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, célula de la retina humana (por ejemplo, PER.C6™), Vero, o HeLa.

Se describe, además, un método que se proporciona para producir una glicoproteína, que comprende expresar una glicoproteína en una célula de mamífero, en donde la célula de mamífero comprende un gen de FX modificado.

50 En una modalidad, se proporciona un método para producir una glicoproteína que es una proteína de unión a antígenos, que comprende cultivar una célula CHO que expresa una glicoproteína en medio de cultivo en condiciones suficientes para que la célula CHO exprese la glicoproteína, y recuperar la glicoproteína expresada a partir de la célula CHO o del medio de cultivo. En una modalidad, la glicoproteína expresada no está fucosilada en más de aproximadamente el 5 %. En una modalidad, no está fucosilada en más de aproximadamente el 4 %, 3 %, 2 %  
55 %, 1 %, o 0,5 %. En una modalidad específica, el por ciento de fucosilación es un por ciento en mol de la fucosa respecto a los glicanos. En una modalidad específica, el por ciento de fucosilación es un por ciento en mol de la fucosa respecto a la glicoproteína. En una modalidad específica, la relación molar de la proteína no fucosilada respecto a la fucosilada es aproximadamente 0,90 a 0,10, aproximadamente 0,91 a 0,09, aproximadamente 0,92 a 0,08, aproximadamente 0,93 a 0,07, aproximadamente 0,94 a 0,06, aproximadamente 0,95 a 0,05,  
60 aproximadamente 0,96 a 0,04, aproximadamente 0,97 a 0,03, aproximadamente 0,98 a 0,02, o aproximadamente 0,99 a 0,01.

65 En una modalidad, la glicoproteína comprende una región inmunoglobulínica CH2 y CH3 que tiene en la posición 297 (numeración EU) la siguiente porción de glicano: GlcNAc(1) unido a la glicoproteína a través del enlace con N; GlcNAc(1)-GlcNAc(2)-Manosa(1), en donde Manosa(1) porta una primera y una segunda porción, en donde la primera porción consiste esencialmente en Manosa(2)-ManGlcNAc(3); y en donde la segunda porción consiste

esencialmente en Manosa(3)-GlcNAc(4). En una modalidad, la porción de carbohidrato consiste además esencialmente en a Gal(1) unido a GlcNAc(4). En otra modalidad, la porción de carbohidrato consiste además esencialmente en una Gal(1) unida a GlcNAc(4) y una Gal(2) unida a GlcNAc(3).

5 En una modalidad, la glicoproteína fucosilada comprende una porción de glicano idéntica a la porción de glicano no fucosilada descrita en el párrafo inmediatamente anterior a este párrafo, pero además porta una porción de fucosa en GlcNAc(1).

10 En la célula modificada genéticamente proporcionada, la modificación es en un gen de FX, y la modificación da como resultado la célula productora de un ARNm de FX que codifica una proteína FX que comprende una serina en la posición 289 y al menos una de 79S, 90K, 136L, y 211R y en donde la célula muestra una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación del gen de FX.

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

20 En una modalidad, la célula expresa, además, una proteína que contiene Fc. En una modalidad, la proteína que contiene Fc es un anticuerpo.

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

30 En una modalidad, la glicosilación comprende un grupo trimanosil de dos antenas. En una modalidad, la relación molar de la fucosa respecto al grupo trimanosil de dos antenas no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una modalidad, la relación molar de la fucosa respecto al grupo trimanosil de dos antenas en la proteína fucosilada que contiene Fc no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200.

35 En una modalidad, la proteína que contiene Fc es un anticuerpo, y la glicosilación comprende una porción de glicano en la posición 297 del Fc. En una modalidad, la relación molar de la fucosa con respecto a la porción de glicano no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 200. En una modalidad, la porción de glicano comprende dos residuos de GlcNAc en tándem seguidos por una porción trimanosil de dos antenas, en donde cada una de las dos porciones manosil terminales de la porción trimanosil porta un residuo de GlcNAc. En una modalidad, la relación molar de la fucosa respecto a GlcNAc en el glicano no es mayor que 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400, o 1:800.

40 En un aspecto, la célula de mamífero modificada proporcionada ectópicamente expresa una glicoproteína, la modificación comprende una secuencia de ácido nucleico de FX modificada, y la célula comprende una vía de rescate de fucosa y una vía de síntesis de fucosa *de novo* y expresa una proteína FUT 8 funcional y una proteína GMD funcional, en donde la vía de síntesis de fucosa *de novo* es incapaz de fucosilar sustancialmente una glicoproteína debido a la modificación de la secuencia de ácido nucleico de FX a aproximadamente 37 °C, pero es capaz de fucosilar sustancialmente la glicoproteína a aproximadamente 34 °C.

45 Los aspectos y modalidades individuales descritos en la presente están destinados a emplearse solos o en combinación con cualquier otro aspecto o modalidad, a menos que se indique expresamente de cualquier otra manera o a menos que el contexto no permita dicha combinación.

50 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un alineamiento en MacVector™ para la secuencia de la proteína FX (de arriba hacia abajo) de mono (*Macacca mulatta*), sec. con núm. de ident.:3; humano, sec. con núm. de ident.:4; ratón (*Mus musculus*), sec. con núm. de ident.:5; rata (*Rattus norvegicus*), sec. con núm. de ident.:6; CHO (*Cricetulus griseus*), sec. con núm. de ident.:1; y CHO con una modificación L289S y N90K (línea celular designada como 8088), sec. con núm. de ident.:2.

La Figura 2 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 3033, 6066, 7077, y 8088 antes y después de la tinción con LCA.

La Figura 3 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 4044-1 no teñidas, e histogramas de las células 4044-1, 6069, 2020, y 2121 teñidas con LCA.

La Figura 4 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 5055 no teñidas, e histogramas de las células 5055, 8088, y 1010 teñidas con LCA.

La Figura 5 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 4044-1 y 6066-1 cultivadas a 37 °C y 34 °C antes y después de la tinción con LCA.

5 La Figura 6 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 3033, 7077, 8088, y 1010 cultivadas en medios con y sin L-fucosa 5 mM, e histogramas de las células 5055 cultivadas en medio sin L-fucosa. Todas las células se tiñeron con LCA.

10 La Figura 7 muestra histogramas de citometría de flujo de las células 8088 transfectadas establemente con pR4009, pR4010, y pR4011, y células 5055.

La Figura 8 muestra la separación de glicanos mediante HPLC para el Ac 3.1 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa (1,47 % de fucosilación).

15 La Figura 9 muestra los resultados de espectrometría de masa para los glicanos de la Figura 8; las estructuras de los glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan mediante cuadrados; los residuos de manosa se representan mediante círculos; los residuos de galactosa se representan mediante rombos.

20 La Figura 10 muestra la separación de glicanos mediante HPLC para el Ac 3.1 en células 8088 cultivadas a 37 °C en presencia de fucosa 10 mM (95,22 % de fucosilación).

25 La Figura 11 muestra los resultados de espectrometría de masa para los glicanos de la Figura 10; las estructuras de los glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan mediante cuadrados; los residuos de manosa se representan mediante círculos; los residuos de galactosa se representan mediante rombos; los residuos de fucosa se representan mediante triángulos.

La Figura 12 muestra la separación de glicanos mediante HPLC para el Ac 3.2 en las células 8088 cultivadas a 37 °C en ausencia de una fuente de fucosa externa (5,73 % de fucosilación).

30 La Figura 13 muestra los resultados de espectrometría de masa para los glicanos de la Figura 12; las estructuras de los glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan mediante cuadrados; los residuos de manosa se representan mediante círculos; los residuos de galactosa se representan mediante rombos.

35 La Figura 14 muestra la separación de glicanos mediante HPLC para el Ac 3.2 en células 8088 cultivadas a 37 °C en presencia de fucosa 10 mM (95,63 % de fucosilación).

40 La Figura 15 muestra los resultados de espectrometría de masa para los glicanos de la Figura 14; las estructuras de los glicanos se presentan a la derecha de cada pico. Los residuos de GlcNAc se representan mediante cuadrados; los residuos de manosa se representan mediante círculos; los residuos de galactosa se representan mediante rombos; los residuos de fucosa se representan mediante triángulos.

45 La Figura 16 resume los resultados de los estudios de espectrometría de masa en líneas celulares de tipo silvestre y de baja fucosilación. Los residuos de GlcNAc se representan mediante cuadrados; los residuos de manosa se representan mediante círculos; los residuos de galactosa se representan mediante rombos; los residuos de fucosa se representan mediante triángulos.

#### Descripción

50 La invención no se limita a los métodos particulares y las condiciones experimentales descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. La terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no está destinada a ser limitante, dado que la invención se define por las reivindicaciones concedidas.

55 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos y frases usados incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o resulte claramente evidente a partir del contexto en el cual se usa el término o frase. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales particulares.

60 La referencia al singular (por ejemplo, "un/una" o "el/la") está destinada a incluir la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente que se excluye la referencia al plural.

65 El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región

constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones del marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una KD con respecto a su epítipo objetivo aproximadamente de  $10^{-9}$  M o inferior (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, o aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M). En una modalidad, la KD se mide mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™; en otra modalidad, la KD se mide mediante ELISA.

La frase "proteína de unión" incluye cualquier proteína que sea capaz de reconocer específicamente una pareja de unión. El reconocimiento específico generalmente requiere que la proteína de unión se una a su pareja de unión con una constante de disociación (KD) no mayor que unos pocos micromolares, y en la mayoría de los casos las proteínas de unión convenientes se unen a sus parejas de unión en el intervalo nanomolar, por ejemplo, en diversas modalidades en el orden de menos de cien nanomolar. La mayoría de las proteínas de unión descritas en la presente son, además, proteínas que contienen Fc, es decir, comprenden una porción de unión fusionada con un Fc que comprende al menos una porción funcional de una región inmunoglobulínica CH2 y CH3. Las proteínas de unión típicas son anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), inmunoadhesinas, trampas (por ejemplo, trampas de citocinas tal como trampas de IL-1; trampa de VEGF, etcétera). Las proteínas de unión típicas que no son anticuerpos portan una porción de unión (por ejemplo, un receptor o fragmento de este, un ligando o fragmento de este, una variación en un dominio variable inmunoglobulínico canónico, etcétera) y una porción de inmunoglobulina que frecuentemente comprende un dominio inmunoglobulínico CH2 y uno CH3 (o fragmento de este que retiene una función efectora Fc). Por lo tanto, las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para producir proteínas de unión (por ejemplo, que incluyen inmunoadhesinas y trampas) que portan una región inmunoglobulínica que se une a un receptor Fc y/o que activa el complemento (por ejemplo, una región funcional CH2 y CH3) y así es capaz de mediar la ADCC y/o CDC.

Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión antigénica específicos para más de un polipéptido objetivo. Las proteínas de unión multiespecíficas que son biespecíficas pueden diseñarse para comprender dos brazos inmunoglobulínicos, por ejemplo, en donde el primer brazo de una inmunoglobulina es específico para un primer epítipo, y el segundo brazo de la inmunoglobulina es específico para un segundo epítipo. Otras proteínas de unión multiespecíficas incluyen aquellas en donde el segundo brazo porta una porción de unión (un ligando o un receptor o fragmento de unión de estos) que se une específicamente a un objetivo que es una proteína o pareja de unión no proteica.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítipo diferente—lo mismo en dos moléculas diferentes (**por ejemplo**, diferentes epítopos en dos antígenos diferentes) o en la misma molécula (**por ejemplo**, diferentes epítopos en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo generalmente será al menos de uno a dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud inferior que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos a los que se une específicamente el anticuerpo biespecífico pueden estar en el mismo objetivo o en un objetivo diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias variables de las cadenas pesadas que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno pueden fusionarse a secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas o diferentes regiones constantes de las cadenas pesadas, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de la cadena pesada, seguidas por (del N-terminal al C-terminal) un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que puede no conferir especificidad de unión al epítipo pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o puede asociarse con cada cadena pesada y puede unirse a uno o más de los epítopos que se unen a las regiones de unión al epítipo de la cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

Un ejemplo de un formato de proteína de unión biespecífica emplea un primer dominio inmunoglobulínico (Ig) CH3 y un segundo dominio Ig CH3, en donde el primer y el segundo dominios Ig CH3 difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos la diferencia de un aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la Proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácidos. En una modalidad, el primer dominio Ig CH3 se une a la Proteína A y el segundo dominio Ig CH3 contiene una mutación que reduce o anula la unión a la Proteína A tal como una modificación 435R (según la numeración EU; 95R según la numeración de exones IMGT). El segundo CH3 puede comprender, además, una modificación 436F (según la

numeración EU; 96F según la numeración IMGT). Otras modificaciones que pueden encontrarse dentro del segundo CH3 incluyen 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, y 4221 (según la numeración EU; 16E, 18M, 44S, 52N, 57M, y 82I según la numeración IMGT). En este formato, el primer dominio Ig CH3 se fusiona a una primera porción de unión (por ejemplo, un primer dominio variable Ig que se une específicamente a un primer epítipo), y el segundo dominio Ig CH3 se fusiona a una segunda porción de unión (por ejemplo, un segundo dominio variable Ig que se une específicamente a un segundo epítipo, en donde el primer y el segundo epítopos son diferentes).

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. Las células que no comprenden naturalmente una vía para la fucosilación pueden modificarse genéticamente para contener una (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2010/0028951A1), y la célula puede modificarse para emplear un gen de FX que se modifica como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), hámster sirio, mieloma de rata, mieloma de ratón (por ejemplo, SP2/0, NS0), célula de retina, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, una célula de mieloma humano, célula tumoral, una célula de linfoma humano (por ejemplo, una célula de Namalwa) y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula es una célula de la retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™).

La frase "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas, y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región inmunoglobulínica CH2 y CH3. Una "porción funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (por ejemplo, un FcγR o un FcRN), y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene delecciones, sustituciones, y/o inserciones u otras modificaciones que la vuelven incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y además incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

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

El término "FX" se refiere a una proteína que muestra actividad GDP-4-ceto-6-desoximanosa-3,5- epimerasa-4-reductasa o a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene actividad GDP-4-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa. La mayoría de los ejemplos descritos en la presente se refieren a una FX de *C. griseus* de tipo silvestre o una FX de *C. griseus* que se modifica de acuerdo con la invención. Sin embargo, "FX" no se limita a la referencia de una célula CHO. Como se muestra en la Figura 1, un alineamiento de secuencias de FX de *Macaca mulatta*, humana, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* revela un grado de conservación muy alto, es decir, las secuencias de FX de diversos organismos son muy, muy similares. Basado en este alto grado de identidad, debe esperarse que las pequeñas diferencias en secuencia que existen entre estas especies no afecten sustancialmente la actividad de FX. Las diferencias entre la secuencia de FX de CHO (sec. con núm. de ident.:1) y las secuencias de mono (sec. con núm. de ident.:3), humano (sec. con núm. de ident.:4), ratón (sec. con núm. de ident.:5), y rata (sec. con núm. de ident.:6) incluyen lo siguiente: 5H, 8M, 21K, 37D, 51T, 55R, 59E, 62R, 93M, 106A, 107C, 138N, 161Y, 167S, 177Y, 201S, 202S, 202D, 212N, 225Q, 235S, 266H, 266N, 266S, 273T, 274S, 280F, 287S, 291T, 291S, 297C, 310D, 314E. Para la FX de CHO de tipo silvestre de 321 aminoácidos (sec. con núm. de ident.:1), cualquiera de las secuencias de FX de mono, humano, ratón, y rata puede recapitularse mediante la selección de 31 sustituciones diferentes, o  $31/321 \times 100 = 9,6\%$  de la secuencia de FX de CHO de tipo silvestre. Por lo tanto, una FX modificada de la invención incluye una FX de CHO de tipo silvestre (por ejemplo, sec. con núm. de ident.:1) o una FX que tiene al menos un 90,4 % de identidad con una FX de CHO de tipo silvestre, y además porta una sustitución 289S y al menos otra sustitución seleccionada del grupo que consiste en N79S, N90K y G211R. Para menos desviaciones de la sec. con núm. de ident.:1, una FX modificada de la invención es al menos 91

%, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica con la sec. con núm. de ident.:1 y porta la sustitución 289S y al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en N79S, N90K, P136L y G211R. Un experto esperaría que una o más de una pequeña inserción o una o más de una pequeña delección que incluya al menos una de las posiciones 79, 90, 136, 211, y 289 probablemente también proporcione ventajas asociadas con una modalidad de la invención (por ejemplo, una célula que porta el gen modificado mostraría una reducción de la fucosilación de una glicoproteína).

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

La frase "baja fucosilación" o "reducción de la fucosilación" se refiere a una capacidad disminuida o reducida de una célula modificada para fucosilar una glicoproteína en comparación con una célula normal o de tipo silvestre. La glicoproteína puede ser una glicoproteína endógena. Más típicamente, la modificación del ácido nucleico se realiza en una célula que se usa para expresar una glicoproteína heteróloga, por ejemplo, una célula que expresa una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo o anticuerpo biespecífico o una inmuno adhesina u otra glicoproteína que contiene Fc) ectópicamente. Por ejemplo, una línea celular CHO o PERC.6™ modificada de acuerdo con la invención, que expresa, además, un anticuerpo humano, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 humano.

En general, la referencia a una "baja fucosilación" o "reducción de la fucosilación" con respecto a una glicoproteína no se refiere a una sola molécula glicoproteica que tiene menos residuos de fucosa unidos a ella. Más bien, se hace referencia a una preparación de glicoproteína preparada a partir de células, y la preparación de glicoproteína comprende una población de moléculas glicoproteicas individuales, con miembros de la población con diferentes características de glicosilación. Con fines de ilustración y no de limitación, para un anticuerpo IgG1 expresado en una célula CHO modificada de acuerdo con la invención, "baja fucosilación" o "reducción de la fucosilación" se refiere a una menor cantidad de glicoproteínas individuales que tienen un residuo de fucosa en un residuo de GlcNAc unido a N de un glicano en la posición 297 del Fc. Dicha "baja fucosilación" o "reducción de la fucosilación" puede caracterizarse de varias maneras (véase en otra parte en la presente), pero en cada caso se hace referencia a una cantidad relativamente baja (o reducida) de las glicoproteínas de la población que tienen residuos de fucosa en ellas en comparación con una población de la misma glicoproteína producida en una línea celular que carece de una modificación de acuerdo con la invención.

A manera de ilustración, si una glicoproteína producida de acuerdo con la invención está fucosilada en un 1 % en comparación con la misma glicoproteína producida por una célula de tipo silvestre, solo el 1 % de las moléculas de proteína que contiene Fc están fucosiladas en la célula de la invención en comparación con la cantidad de fucosilación observada en una célula de tipo silvestre correspondiente (arbitrariamente establecido como 100 %, ya sea que todas las moléculas de proteína que contiene Fc estén fucosiladas o no en la célula de tipo silvestre en las mismas condiciones).

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

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

Otra manera de caracterizar una preparación de glicoproteína de una célula con "baja fucosilación" o "reducción de la fucosilación" es mediante la relación de la glicoproteína fucosilada con relación a la no fucosilada en la preparación de glicoproteína producida por la célula. Por ejemplo, una preparación de glicoproteína producida por una célula modificada tiene una relación de glicoproteína fucosilada:glicoproteína no fucosilada que es de aproximadamente 1:10 a 1:15, 1:15 a 1:20, 1:20 a 1:40, 1:40 a 1:60, 1:60 a 1:80, 1:80 a 1:100, o 1:100 a 1:150.

Otra manera de caracterizar una preparación de glicoproteína de una célula con "baja fucosilación" o "reducción de

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

Otra manera de caracterizar una preparación de glicoproteína de una célula con “baja fucosilación” o “reducción de la fucosilación” es mediante la cantidad relativa de fucosa con respecto a los glicanos o la cantidad relativa de fucosa con respecto al componente de glicano de la preparación de glicoproteína. Por ejemplo, en el caso de proteínas que contienen Fc (por ejemplo, anticuerpos), la glicosilación comprende un glicano en la posición 297, y el glicano comprende una porción trimanosil de dos antenas. En una modalidad, la relación molar de fucosa con respecto a la porción de glicanos no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una modalidad, la relación de fucosa con relación a la porción trimanosil de dos antenas no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una modalidad, la relación molar de la fucosa respecto a la porción trimanosil de dos antenas en la proteína fucosilada que contiene Fc no es mayor que aproximadamente 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100, o 1:200. En una modalidad, la porción de glicano comprende dos residuos de GlcNAc en tándem seguidos por una porción trimanosil de dos antenas, en donde cada una de las porciones manosil terminales de dos antenas de la porción trimanosil porta un residuo de GlcNAc. En una modalidad, la relación molar de la fucosa respecto a GlcNAc en el glicano no es mayor que 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400, o 1:800.

En una modalidad, la cantidad de anticuerpo proteico producido que está fucosilado se mide mediante desglucosilación del anticuerpo proteico durante la noche con PNGasa F seguido por análisis de oligosacáridos por medio de HPLC, en donde los oligosacáridos que contienen fucosil se cuantifican mediante la integración del área del pico de glicano, y, por ejemplo, la fucosilación de proteínas se calcula basado en el área del pico de glicano. La identidad (y composición) del glicano puede determinarse (y/o cuantificarse) mediante cualquier método adecuado (por ejemplo, espectroscopía de masa).

La frase “tipo silvestre” incluye la referencia a una célula o una actividad que no se modifica de acuerdo con la invención, por ejemplo, una célula que no contiene una secuencia de ácido nucleico de FX modificada o proteína FX modificada. La actividad de FX “de tipo silvestre” incluye la referencia a cualquier parámetro de actividad (por ejemplo, actividad enzimática) que muestra un gen o proteína FX natural o no modificado. En la comparación de la actividad de “tipo silvestre” de una proteína FX y la actividad de una proteína FX modificada, la proteína FX “de tipo silvestre” y la proteína FX modificada se aíslan sustancialmente de la misma manera, a partir de sustancialmente la misma fuente (por ejemplo, el mismo tipo celular, el mismo organismo) y se comparan en sustancialmente las mismas condiciones. En la comparación de la actividad de FX de “tipo silvestre” y la actividad de FX modificada entre células de tipo silvestre y células modificadas, la actividad de FX se mide preferentemente en sustancialmente las mismas condiciones o sustancialmente similares, con una glicoproteína idéntica o sustancialmente idéntica.

## Resumen

Se proporcionan secuencias modificadas de ácidos nucleicos y de proteínas de FX, en donde la modificación da como resultado una célula que es incapaz de mantener la fucosilación de proteínas en ausencia de una fuente de fucosa externa al nivel que una célula que carece de la modificación puede mantener. Las células muestran una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar glicoproteínas (en ausencia de una fuente de fucosa) a una temperatura debido a un interrupción en una actividad enzimática de la vía *de novo* para la síntesis del sustrato para la fucosilación de glicoproteínas, la GDP-L-fucosa. A otra temperatura (superior), la reducción en la capacidad de la célula es mínima o no es sustancial.

La enzima GDP-4-ceto-desoxi-manosa-3,5,-epimerasa-4-reductasa (FX), participa en la vía *de novo* de la síntesis de GDP-L-fucosa, formando GDP-L-fucosa a partir de GDP-4-ceto-6-desoximanosa. La GDP-L-fucosa resultante puede usarse por una célula para producir proteínas fucosiladas, que incluyen anticuerpos fucosilados. Dado que la GDP-L-fucosa sintetasa participa en la vía *de novo*, la reducción de la fucosilación en las células que carecen de suficiente actividad de FX puede rescatarse mediante una vía de rescate. La vía de rescate requiere fucosa, sobre la cual se actúa a través de la vía de rescate para formar GDP-L-fucosa, un sustrato para la fucosilación de proteínas.

Ciertas modificaciones en FX dan como resultado la incapacidad de una célula que tiene un gen de FX modificado para mantener la fucosilación de las proteínas en ausencia de una fuente de fucosa, de manera que una célula que porta la enzima modificada y que expresa, por ejemplo, un anticuerpo recombinante, muestra una reducción sustancial en la capacidad para fucosilar el anticuerpo, en comparación con una célula de tipo silvestre que porta un gen de FX de tipo silvestre.

La incapacidad para mantener una tasa o un nivel de fucosilación de proteínas suficiente debido a las modificaciones del gen de FX descritas en la presente, es sustancialmente dependiente de la temperatura. En particular, las células que portan un gen de FX modificado muestran una incapacidad sustancial para mantener la fucosilación de glicoproteínas a aproximadamente 37 °C (por ejemplo, 7 % de fucosilación de un anticuerpo de

isotipo IgG1 humano), dicha incapacidad se reduce sustancialmente a aproximadamente 34 °C (por ejemplo, 70 % de fucosilación del mismo anticuerpo; véase la Tabla 3). Las células que solo tienen un gen de FX de tipo silvestre, por el contrario, no muestran una gran diferencia en la capacidad para mantener la fucosilación de glicoproteínas a 37 °C en comparación con 34 °C.

5

Vías *de novo* y de rescate para la GDP-fucosa

La GDP-fucosa es un metabolito central en la vía de fucosilación de glicoproteínas; es el donante de fucosa en la fucosilación de glicoproteínas. Todas las fucosiltransferasas de interés conocidas que pueden fucosilar una glicoproteína que comprende un Fc utilizan GDP-fucosa. Por lo tanto, para una fucosilación de glicoproteínas eficiente, debe generarse y mantenerse un conjunto suficiente de GDP fucosa a un nivel suficiente para la producción de glicoproteínas.

10

Existen dos vías principales para la GDP-fucosa: una vía de síntesis *de novo* y una vía de rescate. En muchas células de mamífero, la GDP-fucosa puede producirse a partir de una fuente de carbono suministrada externamente (por ejemplo, glucosa) mediante una vía de fucosilación *de novo*. En la vía *de novo* para la fucosilación, la glucosa entra en la célula a través de un transportador, y es convertida a D-manosa-1-fosfato. Después la D-manosa-1 - fosfato es convertida por la D-manosa-1 - fosfato guaniltransferasa a GDP-manosa. La GDP-manosa es convertida a GDP-4- ceto-6-desoxi-manosa por la GDP manosa 4,6-deshidratasa (GMD). La GDP-4-ceto-6-desoxi- manosa es convertida a GDP fucosa por la GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4- reductasa (FX). La GDP-fucosa es un potente inhibidor por retroalimentación de la GMD. La GDP-fucosa entra en el aparato de Golgi a través de un transportador de GDP-fucosa. Una vez en el aparato de Golgi, la GDP-fucosa es un sustrato para la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa, que fucosila las glicoproteínas.

15

20

25

30

En muchas células de mamífero, también existe una vía de rescate para generar GDP-fucosa a partir de fucosa suministrada externamente. En la vía de rescate, la fucosa se transporta hacia la célula y se fosforila para formar fucosa-1-fosfato, que puede convertirse a GDP- fucosa. La GDP-fucosa se transporta al aparato de Golgi y está disponible como sustrato para la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa. El transporte de fucosa a la célula ocurre presumiblemente mediante difusión facilitada y mediante transporte lisosomal, y la vía de rescate parece ser universal en células de mamífero (véase, por ejemplo, Becker y Lowe (2003) *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, Glycobiology* 13(7):41R-53R).

35

Por lo tanto, en ausencia de una fuente de fucosa, las células fucosilan las glicoproteínas con el uso de fucosa generada mediante la vía de síntesis *de novo*. En presencia de fucosa, las células fucosilan las glicoproteínas mediante el uso de la fucosa transportada a la célula. Por lo tanto, si la vía de síntesis *de novo* se bloquea o se interrumpe, la fucosilación de las glicoproteínas todavía puede producirse, pero solo en presencia de una fuente de fucosa.

40

45

Las composiciones y los métodos descritos les proporcionan a las líneas celulares un bloqueo condicional en una vía para fucosilar una glicoproteína al proporcionar una célula modificada genéticamente que tiene una modificación en una secuencia de ácido nucleico de FX. En las células que contienen tanto una vía *de novo* como una vía de rescate, las células proporcionan una mayor versatilidad. En tales células en ausencia de una fuente de fucosa externa, la fucosilación de una glicoproteína puede reducirse sustancialmente a una temperatura, pero no se reduce sustancialmente a una segunda temperatura. Alternativamente, las tasas o los niveles de fucosilación de glicoproteínas esencialmente de tipo silvestre pueden activarse proporcionando una fuente de fucosa externa, independientemente de la temperatura a la que se mantiene la célula.

Modificaciones de FX

50

Se describe y se proporciona, además, un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de la proteína FX modificada. El ácido nucleico aislado codifica una proteína FX que comprende las sustituciones de aminoácidos 289S y al menos otra modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 79S, 90K, 136L y 211R y una combinación de estas. El ácido nucleico aislado codifica una proteína FX que comprende una serina en la posición 289 y al menos una de 79S, 90K, 136L, y/o 211R.

55

60

65

El ácido nucleico que codifica la proteína FX modificada se usa en cualquier forma adecuada. La idoneidad de la forma del ácido nucleico depende de su uso. Por ejemplo, las formas adecuadas incluyen un ADNc que puede usarse en un vector de expresión para la expresión extracromosómica en una célula, o que puede integrarse (en una ubicación específica, o aleatoria) en un genoma de una célula. Las formas adecuadas incluyen además una secuencia genómica, que se modifica para codificar la(s) sustitución(es) descrita(s) en la presente. Las formas adecuadas también incluyen, por ejemplo, una secuencia de direccionamiento (por ejemplo, uno o más brazos de direccionamiento) para dirigir el ácido nucleico a una ubicación específica en un genoma, por ejemplo, para reemplazar uno o ambos alelos de un gen de FX nativo. Las formas adecuadas incluyen vectores de transformación que dirigen el ácido nucleico a una ubicación específica en una célula, por ejemplo, a un locus de FX, para el reemplazo de una secuencia endógena de ácido nucleico de FX con una secuencia de ácido nucleico de FX de acuerdo con la invención. La modificación de una secuencia endógena de FX puede producirse en uno o ambos

alelos de la célula.

Líneas celulares con fucosilación baja o reducida

5 Se proporcionan composiciones y métodos para líneas celulares con baja fucosilación. Las composiciones incluyen ácidos nucleicos y proteínas que, cuando están presentes en una célula que carece o que carece sustancialmente de una actividad de FX nativa o de tipo silvestre, confieren a la célula una capacidad reducida para fucosilar una glicoproteína, por ejemplo, una glicoproteína que contiene Fc tal como, por ejemplo, un anticuerpo. En diversas modalidades, tales células incluyen células que muestran una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar una glicoproteína a una primera temperatura (por ejemplo, aproximadamente 37 °C), pero retienen la capacidad de fucosilar la glicoproteína a una segunda temperatura (por ejemplo, aproximadamente 34 °C). Por lo tanto, se proporcionan células que pueden cultivarse a una primera temperatura que es inhibitoria de la fucosilación, y las condiciones de cultivo pueden cambiarse a una segunda temperatura que permite la fucosilación.

15 Las líneas celulares con baja fucosilación pueden producirse mediante el uso de cualquier célula adecuada junto con las composiciones y los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, y no a manera de limitación, puede usarse cualquier línea celular empleada comúnmente en la producción de productos biofarmacéuticos. Determinados métodos y composiciones para hacer que tales líneas celulares sean útiles como líneas celulares con baja fucosilación se describen en la presente; otros son obvios o muy evidentes para los expertos en la técnica a la luz de esta descripción. Las células humanas (por ejemplo, HeLa, PERC.6™, etcétera), células CHO, células de ratón, etcétera, pueden modificarse genéticamente como se describe en la presente para generar una línea celular útil. En el caso de las células CHO, por ejemplo, una línea celular con baja fucosilación útil puede producirse mediante la modificación de un solo alelo del gen de FX debido a la observación de que la actividad de FX de CHO parece ser funcionalmente haploide. Por otra parte, en el caso de otras células que muestran una diploidía funcional en el locus de FX, pueden manipularse mediante el reemplazo de un alelo de FX con una secuencia de ácido nucleico de FX modificada como se describe en la presente e inactivar el segundo alelo (de tipo silvestre), o reemplazar ambos alelos de FX con una secuencia de ácido nucleico de FX modificada como se describe en la presente.

30 Las células resultantes incluyen aquellas cuya actividad de FX se caracteriza total o sustancialmente como de baja fucosilación. Es decir, no es necesario que la célula quede completamente desprovista de una proteína FX de tipo silvestre o un gen de FX de tipo silvestre; sin embargo, la célula -en una condición o conjunto de condiciones adecuadas (por ejemplo, una temperatura seleccionada)- debe ser incapaz o sustancialmente incapaz de fucosilar una glicoproteína (por ejemplo, una glicoproteína que contiene Fc) cerca del nivel al cual una célula correspondiente con una actividad de FX normal en general puede fucosilar la misma glicoproteína.

35 La comparación de una célula de acuerdo con la invención y una célula que no contiene la modificación se realiza en las mismas o esencialmente las mismas condiciones (por ejemplo, medios, temperatura, densidad celular, etcétera). Por ejemplo, en diversas modalidades la célula mostrará una capacidad para fucosilar no mayor del 10 % a no mayor del 1 % de la capacidad para fucosilar que muestra una célula de tipo silvestre. Esta comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante la preparación de una célula que tiene la(s) modificación(es) descrita(s) en la presente, y la comparación del nivel de fucosilación de una glicoproteína expresada por la célula (por ejemplo, la expresión de un anticuerpo a partir de una construcción de expresión en la célula) con el nivel de fucosilación de la misma glicoproteína expresada por una célula de tipo silvestre. Para la comparación, las células se cultivan a la misma temperatura y en las mismas condiciones. El nivel de fucosilación de la glicoproteína puede determinarse mediante el uso de cualquier método analítico adecuado conocido en la técnica para cuantificar la cantidad de fucosa presente en una preparación de glicoproteína.

50 En la determinación de la cantidad de glicoproteína que se fucosila, la cantidad de fucosa se compara con la cantidad de glicoproteína total o con la cantidad de glicano obtenido de la proteína.

Líneas celulares deficientes de fucosilación

55 Una serie de líneas celulares de mamífero que son incapaces de fucosilar glicoproteínas se han aislado. El desarrollo de líneas celulares deficientes de fucosilación se ha visto impulsado en gran medida por la necesidad de producir anticuerpos que carezcan de fucosilación. Los anticuerpos que carecen de fucosilación pueden mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) mucho mejor que los anticuerpos fucosilados, debido a una unión alterada a un receptor Fc. Por lo tanto, los anticuerpos que median mejor la ADCC son muy convenientes, particularmente los anticuerpos que comprenden regiones variables dirigidas a células tumorales. Por lo tanto las células que no son capaces de fucosilar glicoproteínas se usan ampliamente en el desarrollo y producción de anticuerpos para usos terapéuticos.

60 Se han desarrollado dos inactivaciones de la vía de fucosilación que dan como resultado la incapacidad de la célula para fucosilar una glicoproteína. La inactivación de la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) da como resultado la incapacidad de transferir la GDP-fucosa a una glicoproteína. La inactivación de GDP manosa 4,6-deshidratasa (GMD) da como resultado la incapacidad para producir GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa a partir de GDP-manosa en la vía *de novo*.

- 5 Las inactivaciones de la fucosilación después de la formación de GDP-fucosa, por ejemplo, las inactivaciones de  $\alpha$ 1,6- fucosiltransferasa, no pueden recurrir a la vía de rescate para fucosilar glicoproteínas en presencia de una fuente de fucosa externa. Esto es porque el bloqueo es distal a la formación de GDP-fucosa, el metabolito que participa en las vías *de novo* y de rescate. Por lo tanto, el suministro de fucosa a las células que tienen una inactivación de este tipo no recuperará la fucosilación de glicoproteínas. Por lo tanto, las inactivaciones de  $\alpha$ 1,6- fucosiltransferasa no ofrecen una ruta simple para manipular selectivamente la capacidad de una célula para fucosilar una glicoproteína.
- 10 Las inactivaciones de la fucosilación antes de la formación de GDP-fucosa, por ejemplo, inactivaciones de GMD, pueden recurrir teóricamente a la vía de rescate para fucosilar glicoproteínas. Esto es porque el bloqueo se produce antes de la formación de GDP-fucosa. El suministro de fucosa a tales células recuperará teóricamente la fucosilación de glicoproteínas. Sin embargo, las líneas celulares que contienen inactivaciones, carecen de versatilidad.
- 15 Los inventores han encontrado que una interrupción selectiva de la vía de fucosilación *de novo* antes de la formación de GDP-fucosa generará una línea celular con un defecto que queda sin efecto al proporcionar una fuente de fucosa, o al mantener las células en condiciones que permiten la fucosilación. Los inventores han modificado células para que tengan un defecto en la vía *de novo* antes de la GDP-fucosa y que pueden cultivarse en ausencia de fucosa en una primera condición y muestran una capacidad sustancialmente reducida para fucosilar una glicoproteína, mientras que en una segunda condición las células pueden fucosilar eficazmente una glicoproteína incluso en ausencia de una fuente de fucosa externa. Una línea celular particularmente versátil de este tipo presenta la opción de activar o desactivar la fucosilación en la línea celular mediante el control de la disponibilidad de una fuente de fucosa externa (o un precursor de fucosa adecuado) y/o el cultivo de las células en una condición que permite la fucosilación o una condición deficiente de fucosilación.
- 20 Los inventores han interrumpido selectivamente la vía *de novo* para la síntesis de GDP-fucosa mediante la generación de una secuencia de ácido nucleico de FX mutada. La proteína FX es una epimerasa-reductasa bifuncional que epimeriza los grupos hidroxilo de C3 y metilo de C5 de la manosa, formando GDP-4-ceto-6-desoxigalactosa. Después una actividad reductasa dependiente de NADPH de la enzima bifuncional reduce la porción ceto para formar GDP-fucosa. El gen de FX está muy conservado, lo que se refleja en los altos grados de identidad y similitud en las proteínas FX. Véase, por ejemplo, Becker y Lowe (2003) *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*, *Glycobiology*, 13(7):41R-53R. Por lo tanto, los datos presentados junto con las mutaciones de FX en las células CHO son aplicables a modificaciones de FX correspondientes en una amplia variedad de células.
- 25 La interrupción selectiva de FX proporciona una mayor versatilidad, que permite a un investigador desfavorecer, o inhibir, la fucosilación mediante el mantenimiento de un cultivo a una primera temperatura; pero permite la fucosilación mediante el mantenimiento del cultivo a una segunda temperatura. En diversas modalidades esto se ilustra mediante un gen de FX modificado, en donde la modificación comprende la modificación de aminoácidos 289S y al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en (para una proteína FX de CHO) N79S, N90K, P136L y G211R, y una combinación de estas. En diversas modalidades, la modificación de FX consiste esencialmente en una modificación seleccionada del grupo que consiste en L289S/N90K, L289S/G211R, L289S/P136L, L289S/N79S, y una combinación de estas.
- 30 Como saben los expertos en la técnica, determinadas células que son diploides muestran fenotipos que reflejan la actividad de solo uno de los dos alelos en loci particulares, por ejemplo, células CHO, y con respecto a esos loci parecen ser funcionalmente haploides (o hipodiploides) desde una perspectiva fenotípica. En tales células, incluso la modificación de un solo alelo como se describe en la presente puede dar lugar a un fenotipo que refleja esencialmente la actividad del alelo modificado, incluso en casos donde el fenotipo no es un fenotipo dominante. Por ejemplo, en las células CHO, una modificación como se describe en la presente de un solo alelo probablemente dé lugar a un fenotipo de FX esencialmente como se describe en la presente, presumiblemente debido a la falta de expresión (o hipoexpresión) del alelo de FX de tipo silvestre.
- 35 En diversas modalidades, la FX es una FX que no es de una célula CHO, y la modificación comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación que corresponde en la FX que no es de CHO a las modificaciones de CHO mencionadas anteriormente. Las modificaciones correspondientes pueden identificarse mediante el alineamiento de la secuencia de la proteína FX de CHO con cualquier otra secuencia de FX de interés (con o sin huecos en el alineamiento) mediante el uso de, por ejemplo, un algoritmo de alineamiento de múltiples secuencias de propósito general tal como ClustalW con parámetros predeterminados (por ejemplo, para FX humana (núm. de acceso AAC50786) y de *C. griseus* (núm. de acceso AAM91926), mediante el uso de MacVector™ v. 10.0.2, por pares: matriz de Gonnet a velocidad de alineamiento lenta, penalización por hueco abierto = 10,0, penalización por extensión del hueco = 0,1; múltiple: serie Gonnet, penalización por hueco abierto = 10,0, penalización por extensión del hueco = 0,2, divergencia de retraso = 30 %, distancia de separación del hueco = 4, sin separación del hueco final, penalizaciones por residuos específicos, y penalizaciones hidrofílicas (residuos hidrofílicos GPSNDQEKR)).

Como una cuestión práctica, alinear una secuencia objetivo contra la sec. con núm. de ident.:1 o la sec. con núm. de ident.:1 y 3-6 en MacVector™ mediante el uso de los parámetros predeterminados para el alineamiento por pares identificará las posiciones correspondientes en la secuencia objetivo en las que deben realizarse las modificaciones en las posiciones equivalentes a las posiciones N79, N90, P136, G211, y L289 de CHO.

5

#### Glicoproteínas

Las composiciones y los métodos pueden usarse para modificar la capacidad de fucosilación de las células para lograr una baja fucosilación de cualquier glicoproteína de interés. Aunque la mayoría de esta descripción se refiere a las ventajas de la reducción de la fucosilación en los anticuerpos, los beneficios de la invención no se limitan a los anticuerpos. Cualquier proteína de unión que porte un Fc -y existen muchos, muchos tipos de tales proteínas de unión- puede producirse mediante el uso de las composiciones y los métodos de la invención.

10

Una glicoproteína típica que puede obtenerse con la invención es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano, de ratón, o humanizado) que está glicosilado y, en condiciones normales en una célula de tipo silvestre, fucosilado. Los ejemplos incluyen, a manera de ilustración y no a manera de limitación, anticuerpos humanos de los subtipos IgG1, IgG2, e IgG4. Las glicofomas de tales anticuerpos incluyen aquellas con una porción de glicano en la posición 297. Las glicofomas típicas en la posición 297 incluyen un GlcNAc unido a N, seguido por un GlcNAc, seguido por una porción trimanosil de dos antenas, seguido por (en cada una de las dos porciones manosil de la porción trimanosil de dos antenas) uno o más residuos de GlcNAc, opcionalmente seguido por un residuo de galactosa en uno o más de los residuos de GlcNAc unidos a la antena de la porción trimanosil de dos antenas. La fucosilación del glicano normalmente se produce en el residuo de GlcNAc inicial unido a N, donde (normalmente) un solo residuo de fucosa se une por medio de una fucosiltransferasa al anticuerpo glicosilado en 297. En diversas modalidades, la relación molar o el por ciento o el grado de fucosilación del anticuerpo se mide con respecto a este residuo de fucosa en relación con la cantidad (o moles) de anticuerpo y/o la cantidad (o moles) de glicano o sustituyente de glicano (por ejemplo, moles relativos de fucosa:anticuerpo, o de fucosa:GlcNAc o fucosa:manosa o fucosa:porción trimanosil o fucosa:galactosa del glicano unido en 297, en una preparación de anticuerpo obtenida a partir de células de tipo silvestre o a partir de células que comprenden una secuencia de ácido nucleico de FX modificada de acuerdo con la invención).

15

20

25

30

#### Líneas CHO con baja fucosilación

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

35

40

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

45

Las células que portaron la modificación del gen de FX y expresaron el Anticuerpo 2 fucosilaron el Anticuerpo 2 solo aproximadamente un 3,6 %, mientras que en ausencia de la modificación del gen de FX las células fucosilaron aproximadamente el 95 % (3 días) o aproximadamente el 76,8 % (12 días) (Tabla 1).

50

Otra línea CHO con baja fucosilación se obtuvo a partir de células CHO K1 que contenían una modificación L289S y una N90K del gen de FX de CHO (designada como línea 8088). El Anticuerpo 1 expresado en estas células mostró solo aproximadamente un 0,96 % de fucosilación (3 días) o 0,71 % de fucosilación (12 días) (Tabla 2).

55

Otra línea CHO con baja fucosilación se obtuvo a partir de células CHO K1 (a partir de células 6066-1, que tienen una modificación L289S del gen de FX) que contenía una sustitución P136L (designada como línea 2121). Estas células expresaron el Anticuerpo 1 que solo se fucosiló en un 0,82 % a los 3 días (Tabla 2).

60

Se produjeron otras dos líneas CHO con baja fucosilación a partir de células CHO K1 (a partir de células 6066-1, que tienen una modificación L289S del gen de FX) que contenía una sustitución N79S (designadas como líneas 2020 y 6069). Estas células expresaron el Anticuerpo 1 que solo se fucosiló en un 0,94 % a los 3 días (2020) o solo se fucosiló en un 0,86 % a los 3 días (6069) (Tabla 2).

65

La dependencia de la fucosilación por la temperatura para el Anticuerpo 1 se analizó mediante el uso de las líneas celulares 4044-1 (sin modificación del gen de FX) y la línea celular 6066-1 (modificación L289S del gen de FX). La línea celular 6066-1 mostró solo 7 % de fucosilación a 37 °C, y aproximadamente 70 % de fucosilación a 34 °C. La

línea celular 4044-1 mostró aproximadamente la misma fucosilación (95-96 %) a 37 °C y 34 °C.

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

## 10 Ejemplos

Ejemplo 1: Líneas celulares de CHO

En la presente se describe una variedad de líneas celulares de CHO, aisladas directa o indirectamente a partir de células CHO K1.

Células RGC10. La línea celular CHO 3033 se generó a partir de células CHO K1 como se describe para las células RGC10 en la patente de Estados Unidos núm. 7,435,553, incorporada en la presente como referencia. Brevemente, las células CHO K1 se transfectaron establemente con el vector pTE158 y pcDNA6/TR (Invitrogen). Las células transfectadas se tamizaron respecto a la expresión de hFcγR1 inducible por doxiciclina, y se seleccionó un clon para obtener la línea celular 3033. Las células 3033 se adaptaron a crecer en cultivo en suspensión en Medio 3 libre de suero.

Células 5055. Las células 5055 son células CHO K1 que se han adaptado a crecer en suspensión en el Medio 2 de biorreactor libre de suero.

Células 4044. Las células 4044 se derivaron de células RGC16 descritas en la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2008/151219 A1 presentada el 04 de junio de 2008, y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2009/0124005A1 presentada el 04 de junio de 2008, y que contiene un casete con sitio loxP en un locus de expresión y estabilidad mejoradas (EESYR). El locus EESYR en 4044 tiene, de 5' a 3' en la cadena codificante, un sitio loxP, un promotor de SV40 tardío, un gen de resistencia a la puomicina, un promotor de CMV, un IRES, un gen eCFP, un sitio lox2272, un promotor de CMV, un gen DsRed, y un sitio lox511. Las células 4044 contienen, además, un vector pcDNA6/TR transfectado establemente.

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

Ejemplo 2: Producción de anticuerpos recombinantes en células CHO

Vectores. Los vectores descritos en la presente tienen las características indicadas, donde la ubicación relativa de las características se presenta con respecto a la cadena codificante, mencionadas de 5' a 3'.

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

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

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

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

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

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

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

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

Lox2272.

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

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

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

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

La capacidad de fucosilación en las células CHO se estudió mediante tinción de LCA de la superficie celular y mediante el análisis de anticuerpos recombinantes producidos a partir de las células CHO. En un estudio, las células 7077 se usaron como las células huésped para la expresión del Anticuerpo 2 (Ac 2), un anticuerpo IgG1 humano contra un receptor de células B humano, según un método descrito en la patente de Estados Unidos núm. 7,435,553. Brevemente,  $1 \times 10^7$  células 7077 se transfectaron con el plásmido pR4000 (cadena pesada, resistencia a la higromicina) y pR4001 (cadena ligera, resistencia a la puromicina) mediante el uso de Lipofectamine™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos transfectados se seleccionaron con higromicina a 400 microgramos/ml y puromicina a 10 microgramos/ml cada uno durante dos semanas en medio F12 que contenía suero fetal bovino al 10 %. Las células que sobrevivieron a la selección se mezclaron y se adaptaron al crecimiento en suspensión en medio de biorreactor libre de suero Medio 2. La expresión de hFcγRI se indujo mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo durante tres días. Los cultivos inducidos se incubaron con 1 miligramo/ml de IgG de conejo durante 18 horas antes de la tinción con un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo anti-Fc humano policlonal de cabra conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Las células se tiñeron durante 1 hora después de lavaron dos veces con PBS antes del análisis mediante citometría de flujo en un clasificador de células MoFlo™ (Fort Collins, CO). Las células con intensidad media de la fluorescencia de FITC en el 5 % superior de la población celular total se clasificaron en un grupo y se denominaron células 7077-1. Las células 7077-1 se expandieron durante 10 días en Medio 2. Para producir el Ac 2 recombinante, las células 7077-1 se sembraron a  $4 \times 10^5$  células/ml en Medio 2 en un matraz de agitación a 37 °C. Tres días más tarde, el medio condicionado se recogió y la proteína del Ac 2 la cual se purificó mediante cromatografía de afinidad con la Proteína A.

Las células CHO 4044 y 6066 se usaron como células huésped para la expresión del Ac 2 y Ac 1, un anticuerpo IgG1 humano contra un receptor de citocina humano. Brevemente, para expresar el Ac 2,  $2 \times 10^6$  células 4044 y  $2 \times 10^6$  células 6066 (cada una con un casete con sitios lox en un locus EESYR) cada una se transfectó con pR4002 (cadena pesada en un casete con sitios lox), pR4003 (cadena ligera y resistencia a la higromicina en un casete con sitios lox), y pR4004 (codifica Cre). Para expresar el Ac 1,  $2 \times 10^6$  células 4044 y  $2 \times 10^6$  células 6066 se transfectó cada una con pR4005 (cadena ligera en un casete con sitios lox), pR4006 (cadena pesada y resistencia a la higromicina en un casete con sitios lox), y pR4004 (codifica Cre). Las células 4044 y 6066 transfectadas se seleccionaron con higromicina a 400 microgramos/ml durante 10 días en medio F12 que contenía FCS al 10 %. Las células sobrevivientes se adaptaron a crecer en suspensión en Medio 1 libre de suero durante siete días. Las células que se han sometido a un intercambio de casetes mediado por Cre en el locus EESYR expresaron EGFP pero no DsRed o ECFP. Las células positivas para EGFP pero negativas para DsRed y ECFP se recolectaron mediante clasificación de células con el uso de un clasificador MoFlo™. Las células derivadas de 4044 que se transfectaron con los genes de Ac 2 y Ac 1 se designaron como células 4044-2 y 4044-1, respectivamente. Las células derivadas de 6066 que se transfectaron con los genes de Ac 2 y Ac 1 se designaron como células 6066-2 y 6066-1, respectivamente. Las células 4044-2, 6066-2, 4044-1, y 6066-1 se expandieron mediante cultivo en Medio 2 durante siete días. Para producir anticuerpos recombinantes, las cuatro líneas celulares se sembraron a  $4 \times 10^5$  células/ml en medio 2 en un matraz de agitación a 37 °C. Tres días más tarde, los medios condicionados se recolectaron y los anticuerpos recombinantes en ellos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con la Proteína A.

Las células CHO 8088 y 1010 también se usaron como células huésped para la expresión del Ac 1. Brevemente, para expresar el Ac 1,  $2 \times 10^6$  células 8088 y  $2 \times 10^6$  células 1010 se transfectaron cada una con pR4007 (cadena ligera y primera porción del gen de resistencia a la higromicina en un casete con sitios lox), pR4008 (cadena pesada y segunda porción del gen de resistencia a la higromicina en un casete con sitios lox), y pR4004 (que codifica Cre). Las células transfectadas que sobrevivieron a la selección con higromicina 400 microgramos/ml se adaptaron a crecer en suspensión en Medio 1 libre de suero. Las células que expresaron EGFP pero no DsRed o ECFP a partir de las 8088 y 1010 transfectadas se aislaron mediante la clasificación de células en un MoFlo™ y se designaron como 8088-1 y 1010-1. Para producir la proteína del Ac 1, las células 8088-1 y 1010-1 se sembraron en matraces con agitación a  $4 \times 10^5$  células/ml. Tres días más tarde, los medios de cultivo se recolectaron y el Ac 1 en ellos se purificó mediante cromatografía con Proteína A.

## Ejemplo 3: Análisis de la fucosilación de los anticuerpos

Las proteínas purificadas de anticuerpo IgG1 humano se desglucosilaron inicialmente con PNGasa F en una condición de desnaturalización (SDS al 0,5 %, TCEP 2 mM, y se bloquearon con NP-40 al 1 %) en Tris 50 mM pH 8,0 con una relación de proteína/enzima de 1 microgramo/0,1 mil a 37 °C durante la noche. Los glicanos liberados se derivatizaron después de manera fluorescente con ácido antranílico a 80°C durante 1 hora. Las muestras se limpiaron previamente para eliminar el ácido antranílico reactivo en exceso con cartuchos Oasis™ HLB de Waters. La mezcla de oligosacáridos se analizó después mediante HPLC de fase inversa, mediante el uso de TFA al 0,5 % en ddH<sub>2</sub>O como fase móvil A, y TFA al 0,045 % en acetonitrilo al 90 %/ddH<sub>2</sub>O al 10 % como fase móvil B. Los glicanos se separaron en una columna Thermo Hypercarb™ (Thermo Fisher, Waltham, MA) (dimensión de 100 x 2,1, tamaño de partícula de 3 micrómetros) mediante la aplicación de un gradiente de 30 a 40 % de B durante 40 minutos. Las señales se detectaron mediante el uso de un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm, y una longitud de onda de emisión de 425 nm. Otros análisis de los picos de glicanos separados por HPLC a través de espectrometría de masa revelaron que se separaron en dos grupos principales; glicanos de dos antenas no fucosilados y glicanos de dos antenas fucosilados. Dentro de cada grupo (fucosilados frente a no fucosilados), los glicanos se separaron además en las formas digalactosil (G2), monogalactosil (G1) o agalactosil (G0). La integración del área del pico correspondiente a las diferentes formas de glicano permite la cuantificación en las poblaciones de cada glicano individual en el anticuerpo monoclonal.

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

Las proteínas codificadas por los genes de FX, GMD, transportador de GDP-fucosa, y FUT8 son componentes de la vía de fucosilación *de novo*. Se determinaron las secuencias del transcrito principal del gen de FX en las líneas celulares de CHO 5055, 4044-1, 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010, y las células 8088, y las secuencias del transcrito principal del gen de GMD en las células 4044-1, 6066-1, 1010, y 8088. Las secuencias de los transcritos principales expresados de los genes de FUT8 y del transportador de GDP-fucosa también se determinaron en células 4044-1 y 6066-1.

Brevemente, el ARN total se aisló de  $5 \times 10^6$  células CHO mediante el uso del kit Micro-Fast Track 2.0 Kit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ADNc para los cuatro genes de fucosilación se sintetizaron a partir del ARN total mediante el uso de Oligo-dT como cebador y el sistema superscript III First-Strand Synthesis System™ (Invitrogen). El ADNc de GMD se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-ctacaatctt ggtgcccca gc-3' sec. con núm. de ident.:7 y 5'-tccagttcag tttctgctgc g-3' sec. con núm. de ident.:8. El ADNc de FX se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-ttccctgaca agaccaccta tcc-3' sec. con núm. de ident.:9 y 5'-tagtgtcgg tgaaccaggc ac-3' sec. con núm. de ident.:10. El ADNc del transportador de GDP-fucosa se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-gatgaggaca gcaggaacaa gc-3' sec. con núm. de ident.:11 y 5'-agcactctt tcaccctctt tgg-3' sec. con núm. de ident.:12. El ADNc de FUT8 se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-agccaagggt aagtaaggag gacg-3' sec. con núm. de ident.:13 y 5'-ttgtagacac cctcatct cg-3' sec. con núm. de ident.:14. Las ADN polimerasas usadas en las reacciones de PCR fueron una mezcla de 20 a 1 de Platinum Taq™ (Invitrogen) y Pfu clonada (Stratagene, La Jolla, CA). Los productos de PCR se purificaron después de electroforesis en gel y se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los productos de ADN clonados se transformaron en células DH10B electrocompetentes. Se seleccionó un mínimo de tres colonias bacterianas a partir de cada transformación para inocular tres cultivos líquidos que contenían LB y ampicilina a 100 microgramos/ml. Los ADN de plásmidos en estos cultivos se purificaron mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep Kit™ (Qiagen). Las secuencias de los productos de PCR clonados se determinaron mediante el uso de los cebadores de M13 ubicados en el vector y los cebadores de PCR para 5' y 3' respectivos. Estas secuencias se compararon con las secuencias del Genbank para los ARNm de FX (número de acceso AF525365), GMD (número de acceso AF525364), transportador de GDP-fucosa (número de acceso AB222037), y FUT8 (número de acceso BD359138) de *C. griseus*.

Se identificaron mutaciones en las secuencias consenso de los transcritos de FX que resultaron en cambios de codones respecto a la secuencia de referencia del Genbank (AF525365) en las células 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010 y 8088 (Tabla 1 y 2). Las secuencias de los transcritos de GMD de las células 4044-1, 6066-1, 1010 y 8088 coincidieron con las secuencias de GMD reportadas en el GenBank (número de acceso AF525364). Las secuencias de los transcritos del transportador de GDP-fucosa y de FUT8 en las células 4044-1 y 6066-1 coincidieron con sus secuencias respectivas reportadas en el GenBank también (números de acceso AB222037 y BD359138).

## Ejemplo 5: La fucosilación en líneas celulares CHO con una sola mutación L289S en el gen de FX

La capacidad de fucosilación relativa en las células 3033, 4044, 6066 y 7077 se estudió primero mediante la tinción de las células con la lectina aglutinina de *Lens culinaris* (LCA). Brevemente,  $2 \times 10^6$  células 4044 y 6066 se incubaron cada una con biotina-LCA (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a 5 microgramos/ml durante una hora. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos. Las células se lavaron después una vez con PBS y se analizaron mediante

5 citometría de flujo. Las células 3033 y las células 7077 se tiñeron con FITC-LCA durante una hora, se lavaron dos veces, y se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 2). Las células 3033, 4044, 6066 y 7077 se tiñeron todas mediante LCA. La intensidad de la tinción con LCA en las células 6066 y 7077 fue significativamente más débil que la intensidad de la tinción con LCA en las células 3033 y 4044 (Figura 2), lo que sugiere que hubo menos fucosilación de las proteínas en las células 6066 y 7077 que en las células 3033 y 4044. Para examinar si las células 6066 y 7077 pudieran usarse como células huésped para la expresión de anticuerpos hlgG1 con bajo contenido de fucosa, las células 4044 y 6066 se transfectaron establemente con plásmidos de expresión para Ac 2 y Ac 1, y las células 7077 se transfectaron establemente con plásmidos de expresión para el Ac 2 (véase el Ejemplo 2). Los Ac 2 y Ac 1 recombinantes se produjeron a partir de las células transfectadas en cultivos de tres días en matraces con agitación así como en cultivos de doce días en biorreactores alimentados de manera discontinua. Los Ac 2 y Ac 1 se purificaron a partir de los medios condicionados y sus niveles de fucosilación se determinaron mediante HPLC (Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 1, 7077-1, 6066-1, y 6066-2 produjeron anticuerpo recombinante con un nivel de fucosilación entre 3,6 % y 8 % en los agitadores y los biorreactores a 37 °C.

10

Designación de la línea celular huésped	Designación de la línea celular de producción	FX consenso Mutación	Anticuerpo reportero	Fucosilación en agitador (%)	Fucosilación en biorreactor (%)
4044	4044-1	Ninguna	Ac 1	89,3	85,8
7077	7077-1	L289S	Ac 2	4,0	
4044	4044-2	Ninguna	Ac 2	95	76,8
6066	6066-1	L289S	Ac 1	7; 8	6,14; 6,86
6066	6066-2	L289S	Ac 2	3,6	

15 Ejemplo 6: Fucosilación en Líneas celulares CHO con dos cambios de aminoácidos en el gen de FX

20 8088 y 1010 son dos líneas celulares aisladas a partir de las células 6066 sin el uso de ácido nucleico recombinante exógeno. 6069, 2020, y 2121 son tres líneas celulares aisladas a partir de las células 6066-1 sin el uso de ácido nucleico recombinante exógeno. Las secuencias del transcrito principal para el gen de FX se determinaron mediante RT-PCR (Tabla 2). Se encontró que estas cinco líneas celulares tenían la misma mutación L289S que en las células 6066 y 7077. Los transcritos de FX en las cinco líneas celulares además portan mutaciones que cambian un aminoácido además del cambio L289S. Estas mutaciones se resumen en la Tabla 2. Las células 8088, 1010, 6069, 2020 y 2121 mostraron una unión reducida al LCA (Figura 4), lo que sugiere reducción de la fucosilación de proteínas en estas células.

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

35 La capacidad de fucosilación en las células 6069, 2020, 2121 también se examinó después de la purificación de la proteína de Ac 1 producida en los cultivos en matraces con agitación. La Tabla 2 muestra que estas tres líneas celulares produjeron Ac 1 con niveles de fucosilación en el intervalo de 0,82 % a 0,94 %.

Designación de la línea celular huésped	Designación de la línea celular de producción	FX Mutación	Proteína reportera	Fucosilación en agitador (%)	Fucosilación en biorreactor (%)
8088 (8088)	8088-1	L289S, N90K	Ac 1	0,96	0,71
1010	1010-1	L289S, G211R	Ac 1	0,94	0,53
	2121	L289S, P136L	Ac 1	0,82	
	2020	L289S, N79S	Ac 1	0,94	

	6069	L289S, N79S	Ac 1	0,87	
--	------	-------------	------	------	--

Ejemplo 7: La capacidad de fucosilación en 6066-1 es dependiente de la temperatura

5 El efecto de las temperaturas de cultivo sobre la fucosilación de proteínas en las células 6066-1 se examinó mediante la tinción con LCA y mediante el análisis de fucosilación de la proteína del Ac 1 producida a partir de estas células. La Figura 5 muestra las tinciones con LCA de las células 4044-1 y 6066-1 cultivadas a 37 °C y 34 °C. Las células 4044-1 cultivadas a 34 °C y 37 °C se tiñeron similarmente por LCA. Las células 6066-1 cultivadas a 34 °C unieron LCA a un nivel que fue significativamente mayor que las células 6066-1 cultivadas a 37 °C. La Tabla 3 muestra el nivel de fucosilación en la proteína del Ac 1 producida a partir de las células 4044-1 y 6066-1 en cultivos en matraces con agitación a 34 °C y 37 °C. Las células 4044-1 produjeron Ac 1 con 96 % y 95 % de fucosilación cuando se cultivaron a 34 °C y 37 °C respectivamente. Por el contrario, las células 6066-1 produjeron Ac 1 con aproximadamente 70 % y 7 % de fucosilación a 34 °C y 37 °C respectivamente. Este resultado indica que el nivel de fucosilación en las células 6066-1 es dependiente de la temperatura.

Designación de la línea celular de producción	Mutación de FX consenso	Temp. de cultivo (°C)	Fucosilación en el Ac 1 (%)
4044-1	Ninguna	37	95
4044-1	Ninguna	34	96
6066-1	L289S	37	7
6066-1	L289S	34	70

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

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

Las capacidades de fucosilación relativa de las células 3033, 5055, 7077, 8088 y 8088 cultivadas en Medio 2 con y sin L-fucosa 5 mM se examinaron mediante tinción con LCA (Figura 6). Las células 3033 y 5055 unieron niveles similares de LCA con y sin suplementación de L-fucosa. Las células 7077, 8088 y 8088 unieron significativamente más LCA cuando se cultivaron en medios con L-fucosa 5 mM que en medios que carecían de L-fucosa. Este resultado sugiere que las células 7077, 8088 y 8088 tenían un transportador de GDP-fucosa funcional y una proteína FUT8 funcional.

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

Para confirmar que la reducción del nivel de fucosilación observado en las células 8088 se debió al gen de FX mutante (con las mutaciones L289S y N90K), el gen de FX de tipo silvestre y el gen de FX mutante se expresaron en células 8088 mediante transfección estable y después se examinó la capacidad de fucosilación de las células transfectadas mediante tinción de las células con LCA. Como control, las células 8088 se transfectaron separadamente con el vector pR4009 (casete con sitios lox que tiene un gen de resistencia a la higromicina y un gen de EGFP). Los vectores pR4010 y pR4011 contienen el gen de FX de tipo silvestre y el gen de FX L289S N90K situado entre el promotor de CMV y el sitio Lox511 en pR4009, respectivamente. Las células 8088 transfectadas con pR4004 y lo mismo con pR4009, pR4010, o pR4011 se seleccionaron con higromicina 400 microgramos/ml durante 14 días. Las células que experimentaron intercambio de casetes mediado por Cre en EESYR expresaron EGFP pero no EYFP. Las células que fueron positivas para EGFP pero negativas para EYFP se aislaron mediante clasificación de células. Después de la expansión en cultivo de tejidos a 34 °C, las células clasificadas se tiñeron secuencialmente con biotina-LCA y PE-estreptavidina. Las 8088 transfectadas con el vector pR4009 y pR4011 mostraron el mismo nivel de tinción con LCA. Por el contrario, las células 8088 transfectadas con pR4010 mostraron

un nivel de tinción con LCA comparable con las células 5055 (Figura 7). En resumen, la proteína FX de tipo silvestre, pero no la proteína FX mutante L289S N90K, fue capaz de restaurar el nivel de fucosilación en las células 8088 como se analizó mediante la tinción con LCA. Este resultado indica que el menor nivel de fucosilación en las células 8088 se debió a la mutación L289S N90K en la proteína FX en estas células.

5

Ejemplo 10: HPLC y espectrometría de masa de los glicanos: Ac 3.1 y 3.2

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

15

Las células 8088 que expresaron el A3.1 en ausencia de fucosa produjeron tres picos principales de glicanos en la HPLC (Figura 8), que representan tres glicanos no fucosilados diferentes en un espectro de masa que difirió en la galactosilación terminal (Figura 9) con aproximadamente 1,47 % de fucosilación. Las células 8088 que expresaron el A3.1 en presencia de fucosa 10 mM produjeron tres picos principales de glicanos en la HPLC (Figura 10), que representan tres glicanos fucosilados diferentes y un glicano no fucosilado en un espectro de masa (Figura 11), con aproximadamente 95,22 % de fucosilación.

20

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

25

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

35

40

Para el análisis de glicanos, alícuotas de 100 microgramos de cada una de las dos muestras de anticuerpos (Anticuerpo 3.1 y Anticuerpo 3.2) se resuspendieron en 45 microlitros de tampón de desnaturalización que contenía Tris 50 mM (pH 8,0), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 2,0 mM, SDS al 0,5 %. La proteína se desnaturalizó mediante calentamiento a 80°C durante 7 min. Los glicanos unidos a N en el anticuerpo se liberaron después de la incubación con PNGasa F 10 mU y NP40 al 1 % a 37 °C durante la noche. Los glicanos liberados se marcaron fluorescentemente mediante la adición de 200 microlitros de solución de derivatización (ácido antranílico 30 mg/ml (AA) y cianoborohidruro de sodio a 20 mg/ml en metanol que contenía acetato de sodio al 4 % (p/v) y ácido bórico al 2 % (p/v)), e incubación a 80°C durante 1 hora. Los glicanos derivatizados con AA se separaron adicionalmente de los reactivos en exceso mediante el uso de un cartucho de extracción en fase sólida (cartucho Oasis™ HLB, Waters Corp.) y se eluyeron en 200 microlitros de acetonitrilo al 5 %. Para la separación por HPLC de los glicanos, se usó una columna Thermo Hypercarb™ (3 µm, 100 x 2,1 mm) a una velocidad de flujo de 0,15 ml/min. La fase móvil A fue TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O, y la fase móvil B TFA al 0,045 % en acetonitrilo al 90 % y 10 % de H<sub>2</sub>O. Una alícuota de 10 microlitros de oligosacáridos derivatizados fluorescentes se mezcló con 90 microlitros de TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O y se inyectó en la columna pre-equilibrada en 25 % de la fase móvil B. Después de la inyección de la muestra, el gradiente se incrementó a 30 % de B durante 5 min, seguido por otro aumento a 43 % de B durante 39 minutos para separar el oligosacárido. Los glicanos marcados con AA se detectaron mediante el uso de un detector de fluorescencia con longitud de onda de excitación de 230 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm. El análisis de espectrometría de masa de los glicanos marcados con AA se realizó mediante el uso de un sistema Shimadzu Axima™ MALDI-TOF. Cien microlitros de los glicanos derivatizados se secaron en vacío de velocidad y se resuspendieron en 10 microlitros de TFA al 0.1 %. Los glicanos concentrados se desalinizaron adicionalmente mediante el uso de Nutip Hypercarb™, y se eluyeron en 30 microlitros de TFA al 0,1 % en acetonitrilo al 65 %, y se secaron con vacío de velocidad. Los glicanos liofilizados se disolvieron de nuevo en 2 microlitros de DHB a 10 mg/ml (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) en acetonitrilo al 70 %, y se rociaron sobre la placa MALDI. Los espectros se obtuvieron en modo lineal negativo, con extracción posterior a 1500 mu, y la potencia del láser se estableció entre 60-90 % de la potencia máxima (6 mW) operado a una longitud de onda de 337 nm.

50

55

60

65

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 5 <120> Células deficientes de fucosilación
- <130> 0851-WO
- <140> Por asignar
- 10 <141> Presentado como adjunto
- <150> 61/183,400
- <151> 2009-06-02
- 15 <150> 61/348,858
- <151> 2010-05-27
- <160> 14
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 321
- <212> PRT
- 25 <213> *Cricetulus griseus*
- <400> 1

```

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

```

30

ES 2 661 074 T3

			260						265				270			
Ser	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lys	Thr	Ala	Ser	Asn	Gly	Lys	
		275						280				285				
Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Pro	Asp	Phe	Arg	Phe	Thr	Pro	Phe	Lys	Gln	Ala	
	290					295					300					
Val	Lys	Glu	Thr	Cys	Ala	Trp	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Glu	Gln	Ala	Arg	
305					310					315					320	
Lys																

<210> 2  
 <211> 321  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

10 <400> 2

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

<210> 3  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Macacca mulatta

<400> 3

```

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

```

- 5 <210> 4
- <211> 321
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 10 <400> 4
- ```

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1      5      10      15
Gly Leu Val Gly Lys Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20      25      30
Leu Pro Gly Glu Asp Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35      40      45

```

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

<210> 5

<211> 321

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

10

```

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

```

<210> 6  
 <211> 321  
 5 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

```

<400> 6
Met Gly Glu Pro His Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1          5          10          15
Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
          20          25          30
Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
          35          40          45
Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
          50          55          60
His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65          70          75          80
Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
          85          90          95
Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
          100          105          110
Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
          115          120          125
Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
          130          135          140
Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145          150          155          160
His Gly Cys Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
          165          170          175
Tyr Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
          180          185          190
His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
          195          200          205
Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
210          215          220
Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225          230          235          240
Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
          245          250          255

```

ES 2 661 074 T3

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Ser Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260 265 270  
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275 280 285  
 Leu Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Phe Cys Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290 295 300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Glu Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Lys

- 5 <210> 7
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> sintética
  
- 10 <400> 7
- ctacaatctt ggtgccaga gc** **22**
  
- 15 <210> 8
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 20 <223> sintética
  
- <400> 8
- tccagttcag tttctgctgc g** **21**
  
- 25 <210> 9
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>
- <223> sintética
  
- <400> 9
- ttccctgaca agaccaccta tcc** **23**
  
- 35 <210> 10
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 40 <220>
- <223> sintética
  
- <400> 10
- tagttgtcgg tgaaccaggc ac** **22**
  
- 45 <210> 11
- <211> 22
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> sintética

|    |                                   |  |           |
|----|-----------------------------------|--|-----------|
|    | <400> 11                          |  |           |
|    | <b>gatgaggaca gcaggaacaa gc</b>   |  | <b>22</b> |
| 5  | <210> 12                          |  |           |
|    | <211> 23                          |  |           |
|    | <212> ADN                         |  |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |           |
| 10 | <220>                             |  |           |
|    | <223> sintética                   |  |           |
|    | <400> 12                          |  |           |
|    | <b>agcaactcttc tcaccctctt tgg</b> |  | <b>23</b> |
| 15 | <210> 13                          |  |           |
|    | <211> 24                          |  |           |
|    | <212> ADN                         |  |           |
|    | <213> Secuencia artificial        |  |           |
| 20 | <220>                             |  |           |
|    | <223> sintética                   |  |           |
|    | <400> 13                          |  |           |
| 25 | <b>agccaagggt aagtaaggag gacg</b> |  | <b>24</b> |
|    | <210> 14                          |  |           |
|    | <211> 22                          |  |           |
|    | <212> ADN                         |  |           |
| 30 | <213> Secuencia artificial        |  |           |
|    | <220>                             |  |           |
|    | <223> sintética                   |  |           |
| 35 | <400> 14                          |  |           |
|    | <b>ttgtagacag cctccatcct cg</b>   |  | <b>22</b> |

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Una célula que expresa una proteína GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) con una modificación, en donde la modificación de la proteína FX comprende la sustitución de aminoácidos 289S y al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en las siguientes sustituciones de aminoácidos: 90K, 211R, 136L, y 79S, en donde la célula expresa, además, una glicoproteína y en donde la modificación de la proteína FX da como resultado al menos un 90 % de reducción en la capacidad de la célula para fucosilar la glicoproteína en comparación con una célula que carece de la modificación.
- 10
2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la modificación comprende las sustituciones de aminoácidos 289S y 90K.
- 15
3. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la célula es una célula CHO.
4. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína FX es al menos 90 % idéntica, o al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 1.
- 20
5. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la glicoproteína es un anticuerpo.
- 25
6. Un método para producir una proteína de unión a antígenos, el método comprende: (a) proporcionar la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, (b) introducir en la célula una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígenos; (c) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar la secuencia de ácido nucleico para producir la proteína de unión a antígenos; y, (d) recuperar la proteína de unión a antígenos expresada por la célula.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo.

```

10      20      30      40      50      60      70
MGEPQGSMRILVVTGGSGLVGKAIQKVVADGAGLPGGEDWVVS SKDADLTDAAQT RAALFEKVRP THV IHLA
MGEPQGSMRILVVTGGSGLVGKAIQKVVADGAGLPGGEDWVVS SKDADLTDAAQT RAALFEKVRP THV IHLA
MGEPHGSMRILVVTGGSGLVGRAIQKVVADGAGLPGGEWVVS SKDADLTDAAQT QALFQK VQP THV IHLA
MGEPHGSMRILVVTGGSGLVGRAIQKVVADGAGLPGGEWVVS SKDADLTDAAQT QALFQK VQP THV IHLA
MGEPQGSRRILVVTGGSGLVGRAIQKVVADGAGLPGGEWVVS SKDADLTDAAQT QALFQK VQP THV IHLA
MGEPQGSRRILVVTGGSGLVGRAIQKVVADGAGLPGGEWVVS SKDADLTDAAQT QALFQK VQP THV IHLA

80      90      100     110     120     130     140
AMVGG LFRN I KYN LDFWRKN VHI NDNV LHS AF E V G A C K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N
AMVGG LFRN I KYN LDFWRKN VHM NDNV LHS AF E V G A R K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N
AMVGG LFRN I KYN LDFWRKN VHI NDNV LHS AF E V G A R K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N
AMVGG LFRN I KYN LDFWRKN VHI NDNV LHS AF E V G T R K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N
AMVGG LFRN I KYN LDFWRKN VHI NDNV LHS AF E V G T R K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N
AMVGG LFRN I KYN LDFWRK K VHI NDNV LHS AF E V G T R K V V S C L S T C I F P D K T T Y P I D E T M I H N G P P H S S N

150     160     170     180     190     200     210
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQYGGCTFTAVIP TNVFGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS S A L T V W G T
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQYGGCTFTAVIP TNVFGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS S A L T V W G T
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQHGCFTTAVIP TNVFGP YDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS D S A L T V W G T
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQHGCFTTAVIP TNVFGP YDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS G S A L T V W G T
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQHGCFTTAVIP TNVFGP HDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS N G S A L T V W G T
FGYSYAKRMIDVQNRA YFQQHGCFTTAVIP TNVFGP HDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSSS N G S A L T V W G T

220     230     240     250     260     270     280
GKPRRQFIYS L D L A Q L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F H G E V T F D T S K S D G G Q Y
G N P R R Q F I Y S L D L A Q L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F H G E V T F D T T K S D G G Q Y
GKPRRQFIYS L D L A R L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F N G E V T F D S T K S D G G Q Y
GKPRRQFIYS L D L A R L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F S G E V T F D S T K S D G G Q Y
GKPRRQFIYS L D L A R L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F C G E V T F D S T K S D G G Q Y
GKPRRQFIYS L D L A R L F I W V L R E Y N E V E P I I L S V G E E D E V S I K E A A E A V V E A M D F F C G E V T F D S T K S D G G Q Y

290     300     310     320
K K T A S N S K L R T Y L P D F R F T P F K Q A V K E T C A W F T D N Y E Q A R K
K K T A S N S K L R T Y L P D F R F T P F K Q A V K E T C A W F T D N Y E Q A R K
K K T A S N G K L R S Y L P D F R F T P F K Q A V K E T C W F T D N Y E Q A R K
K K T A S N G K L R S Y L P D F F C F T P F K Q A V K E T C A W F T E N Y E Q A R K
K K T A S N G K L R A Y L P D F R F T P F K Q A V K E T C A W F T D N Y E Q A R K
K K T A S N G K S R A Y L P D F R F T P F K Q A V K E T C A W F T D N Y E Q A R K

```

Figura 1

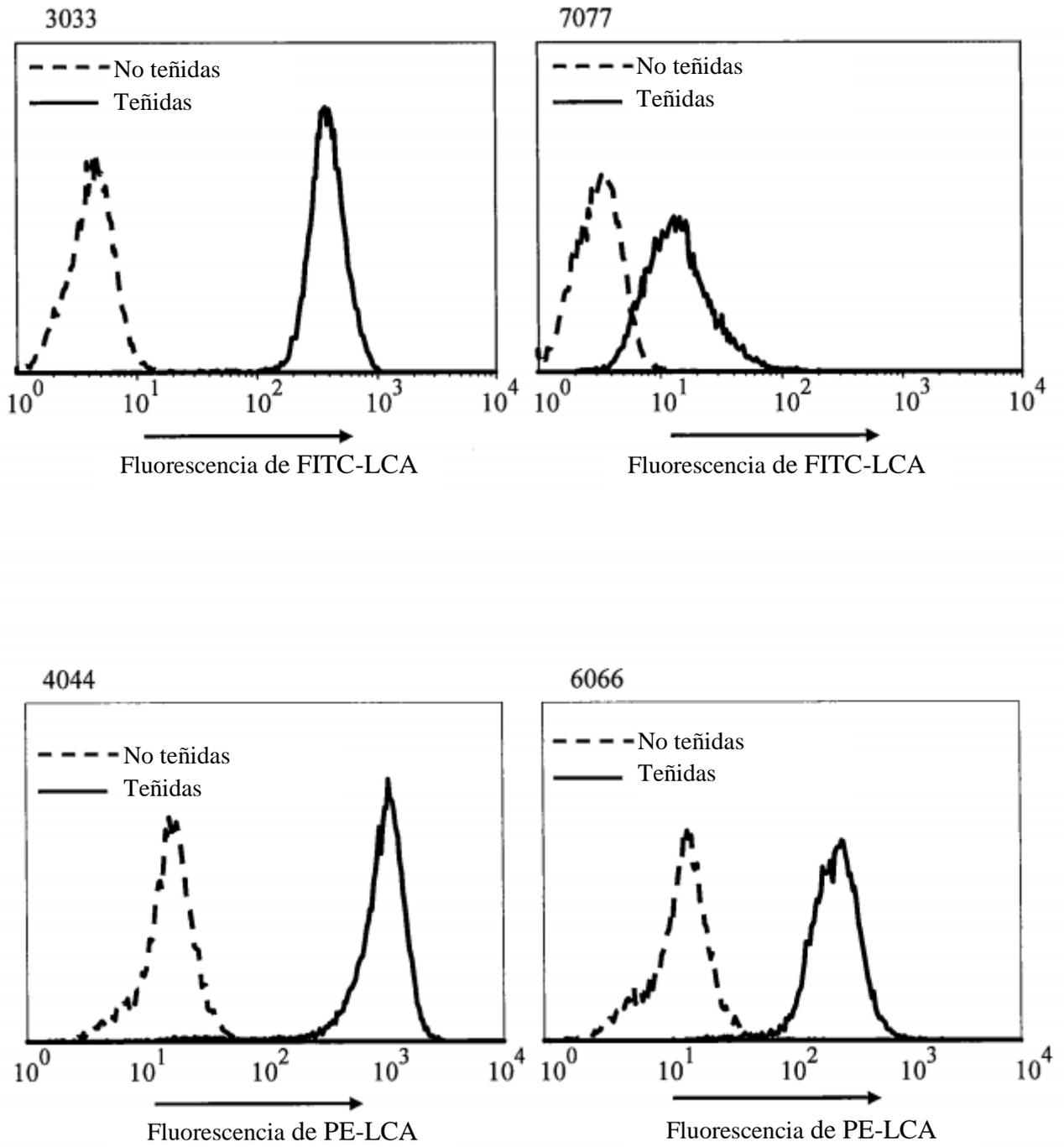


Figura 2

Experimento I:

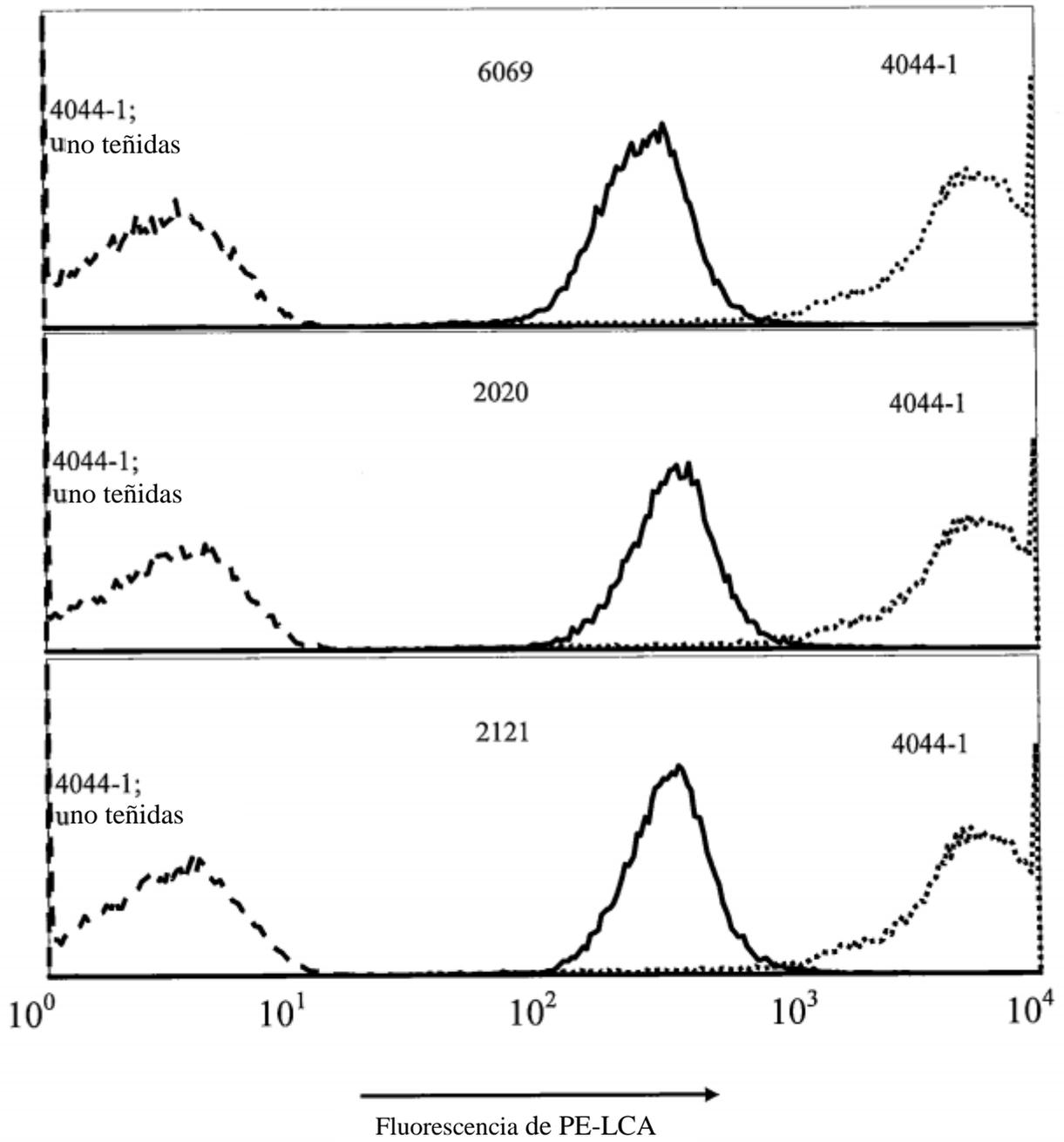


Figura 3

$10^1$   
Experimento II:

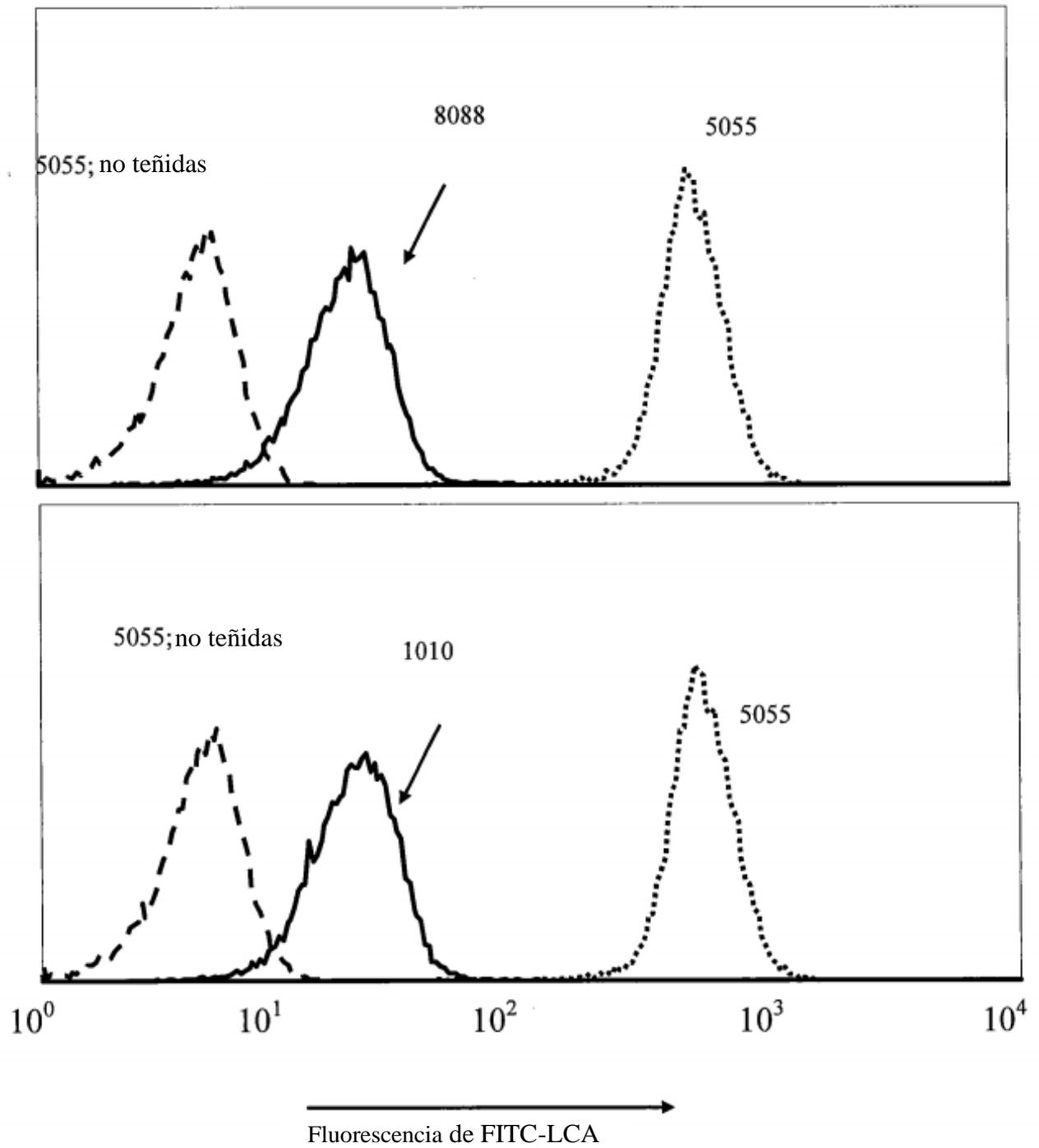


Figura 4

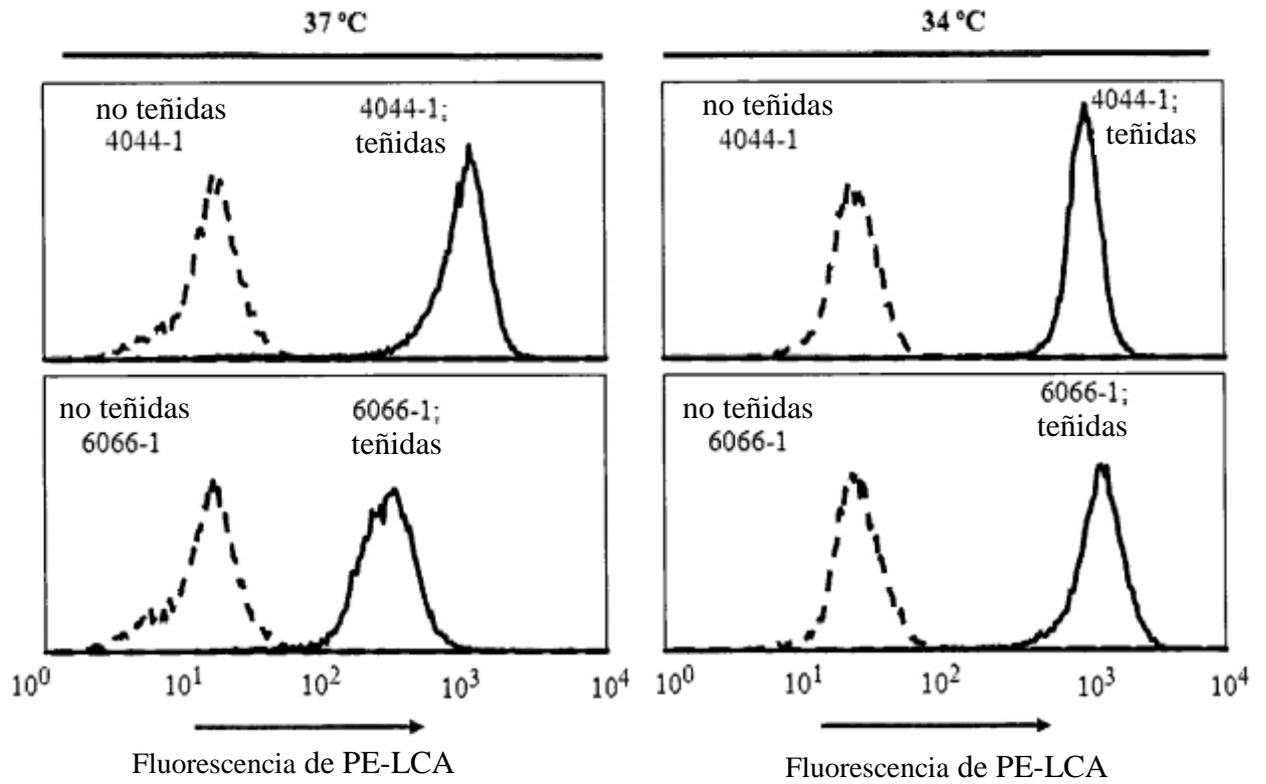


Figura 5

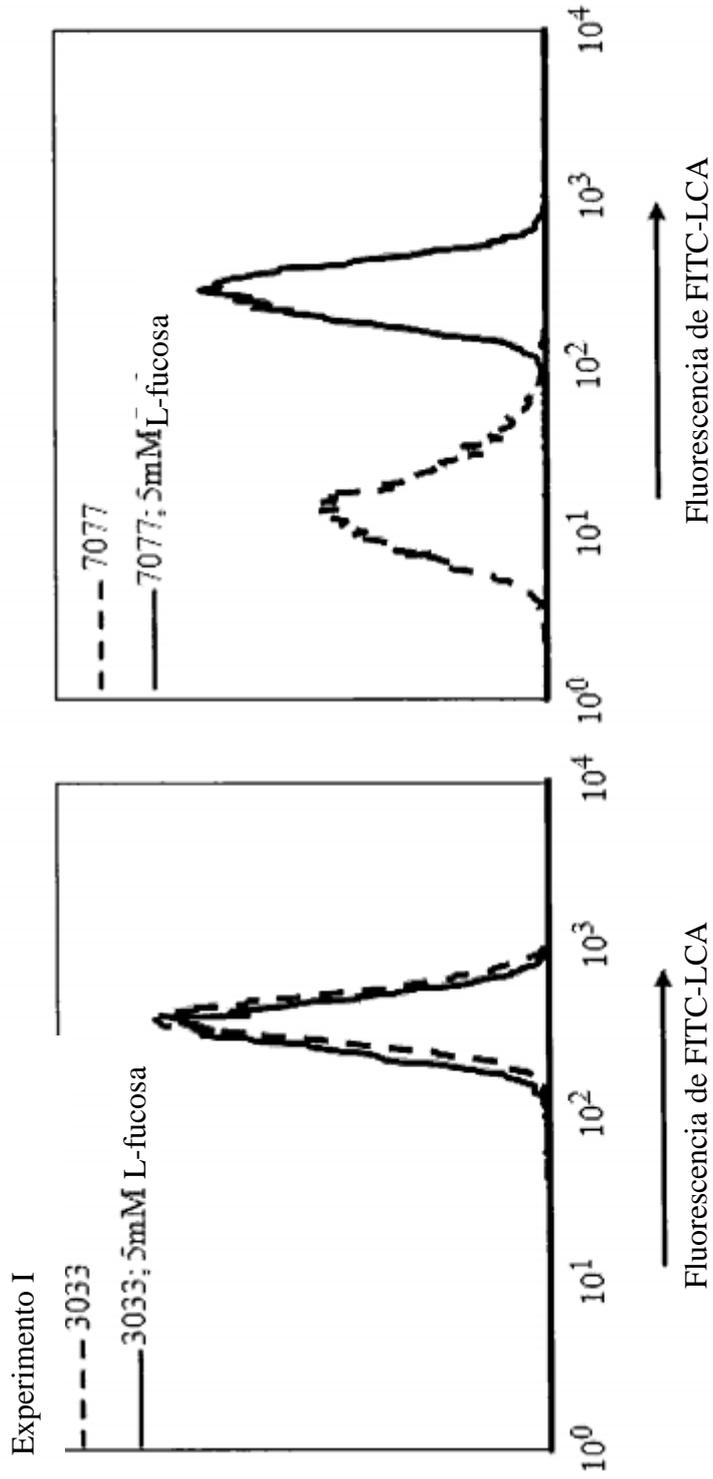


Figura 6A

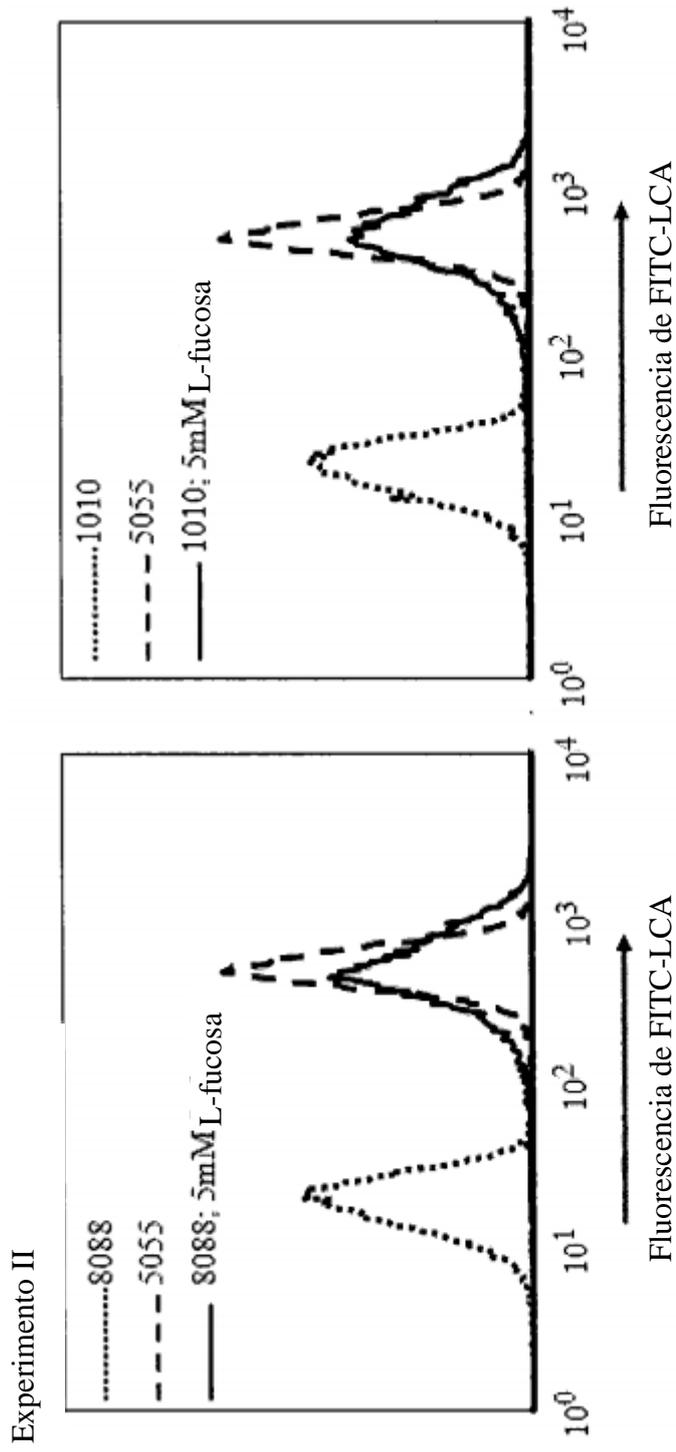


Figura 6B

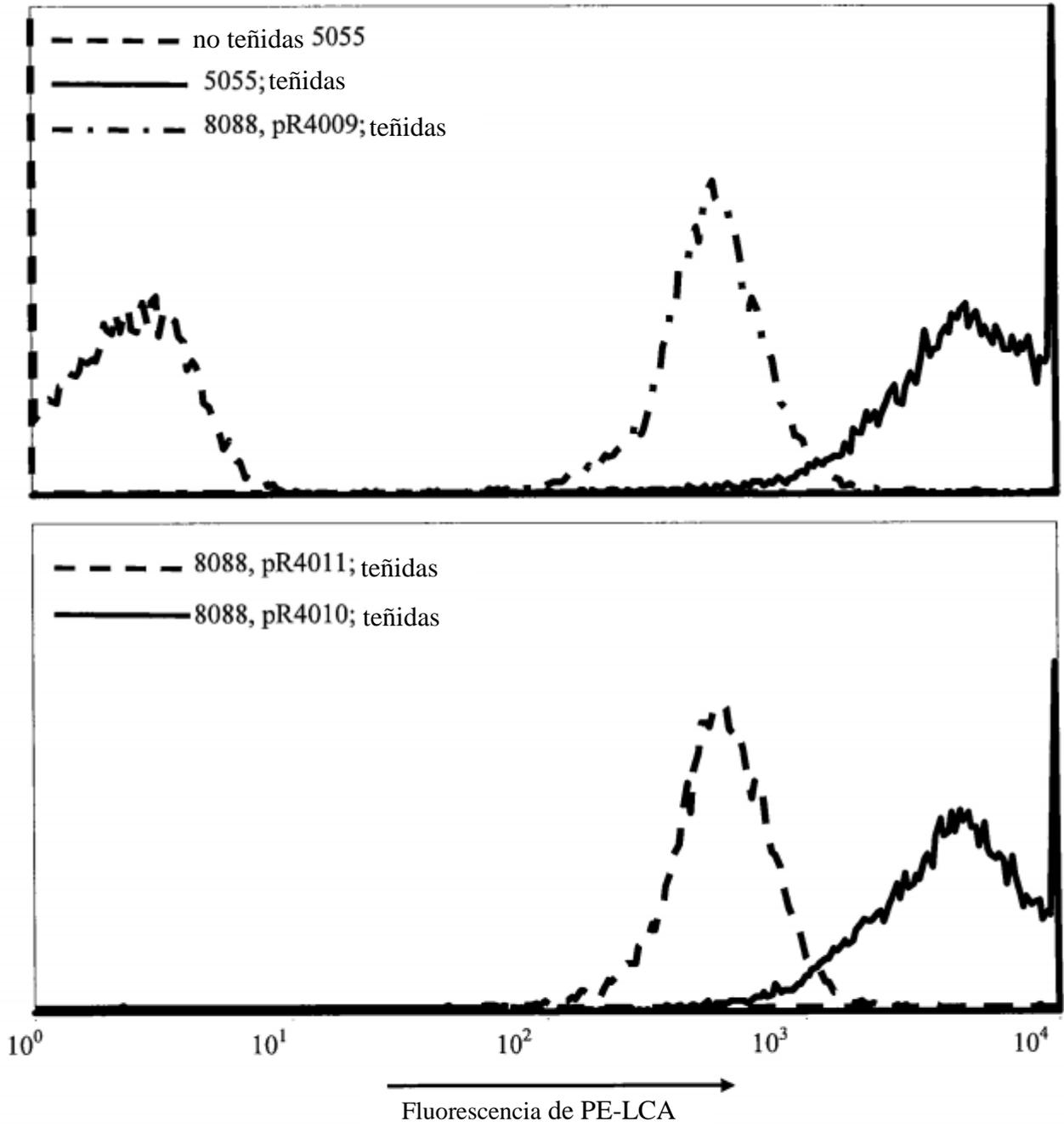


Figura 7

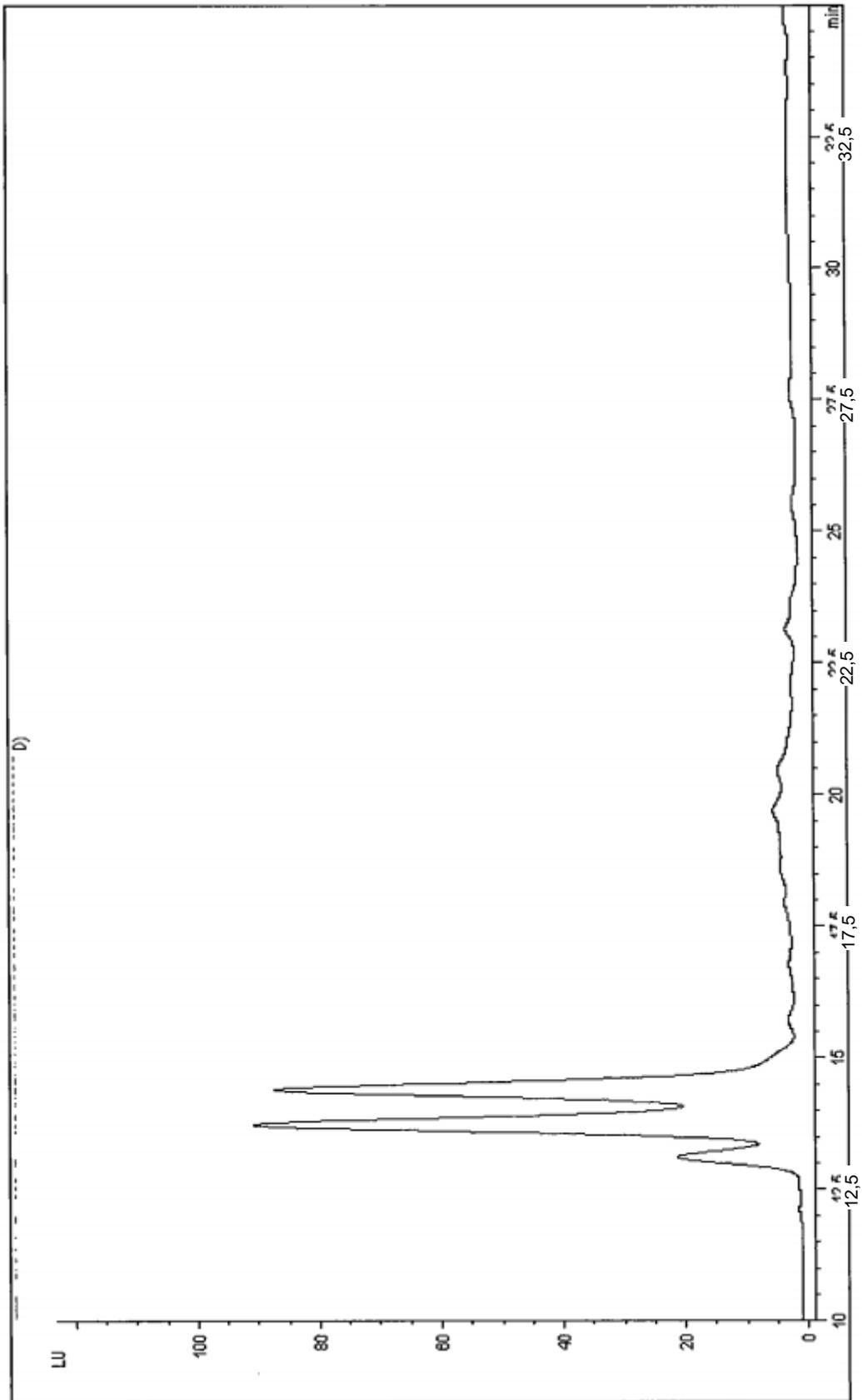


Figura 8

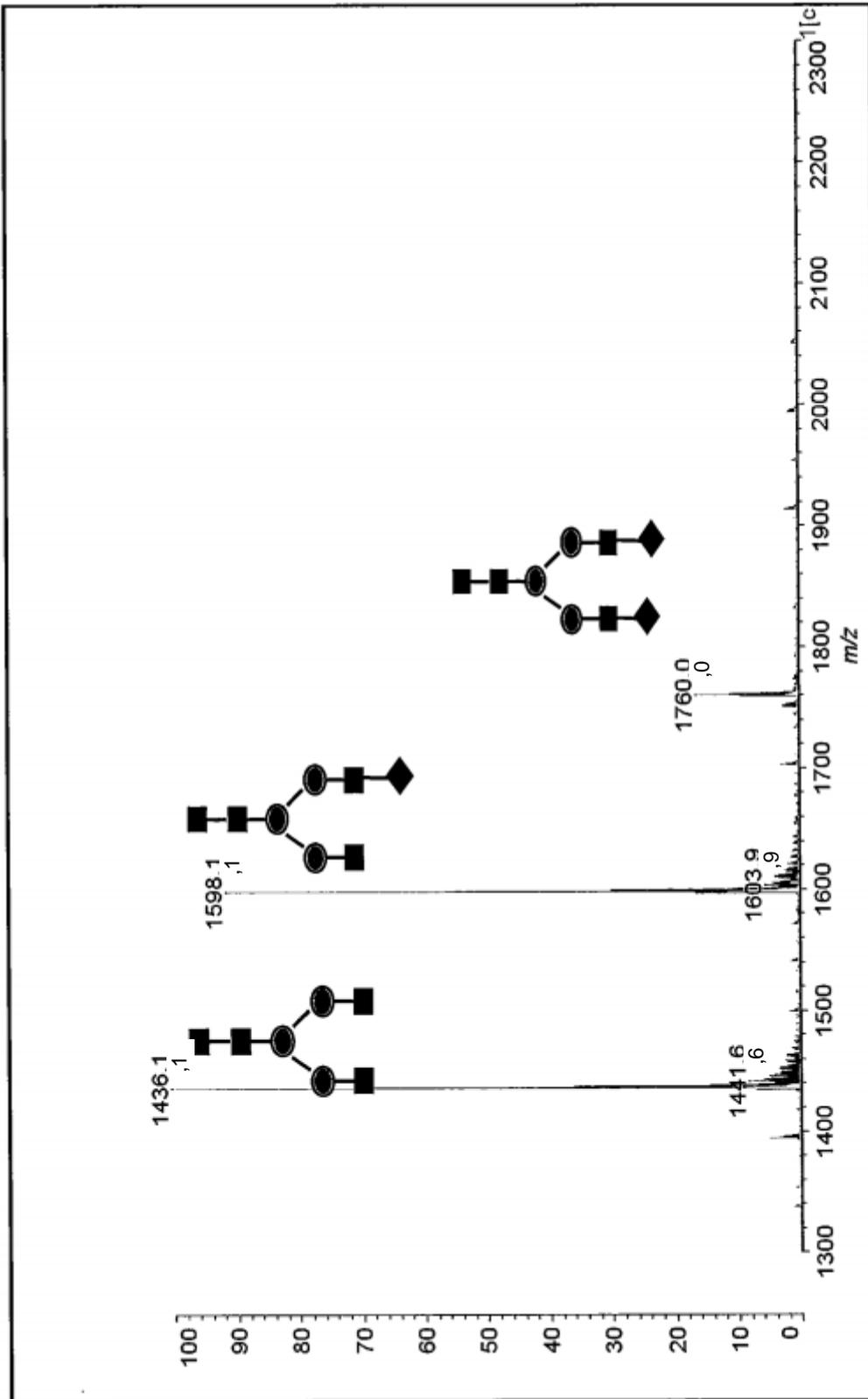


Figura 9

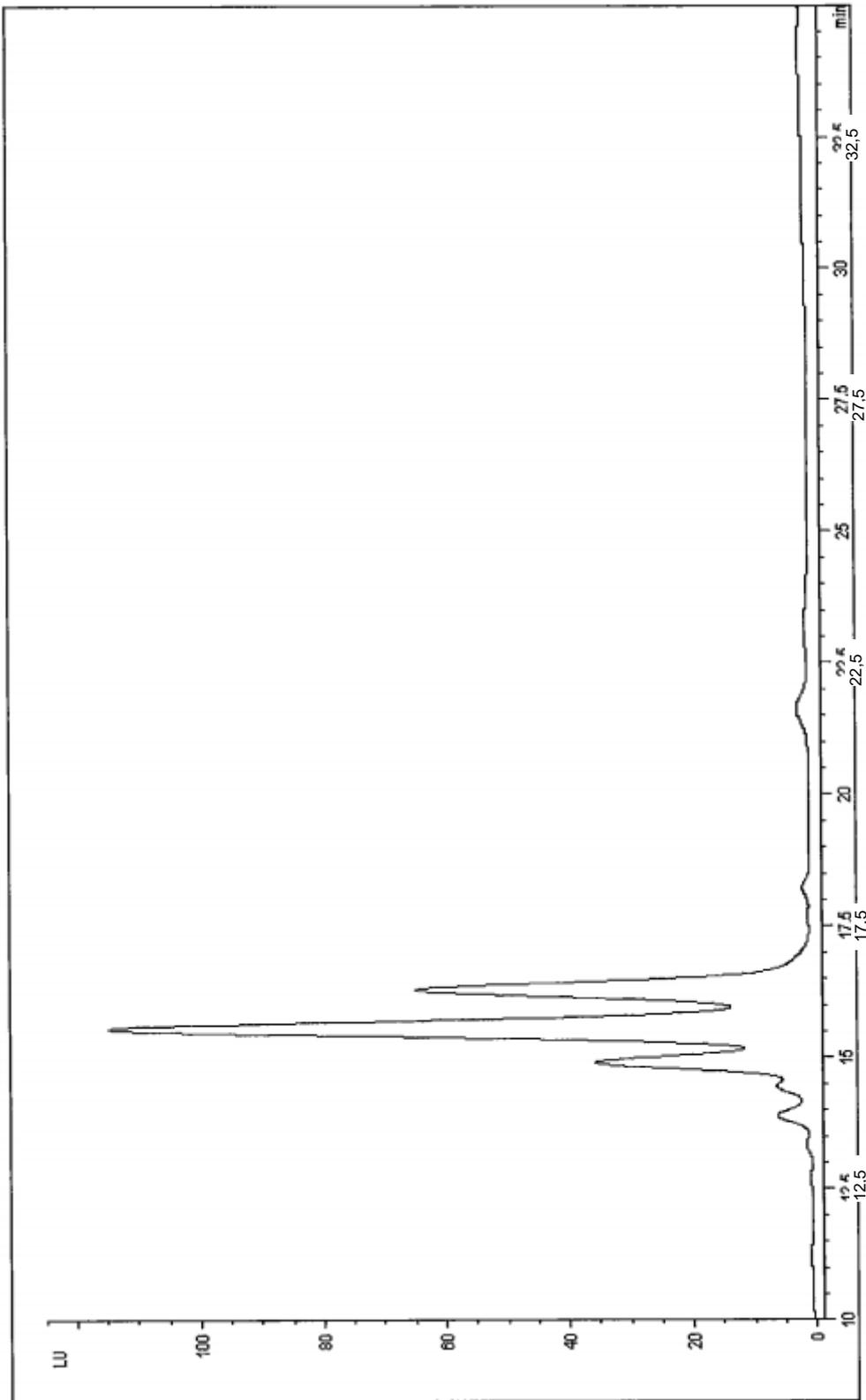


Figura 10

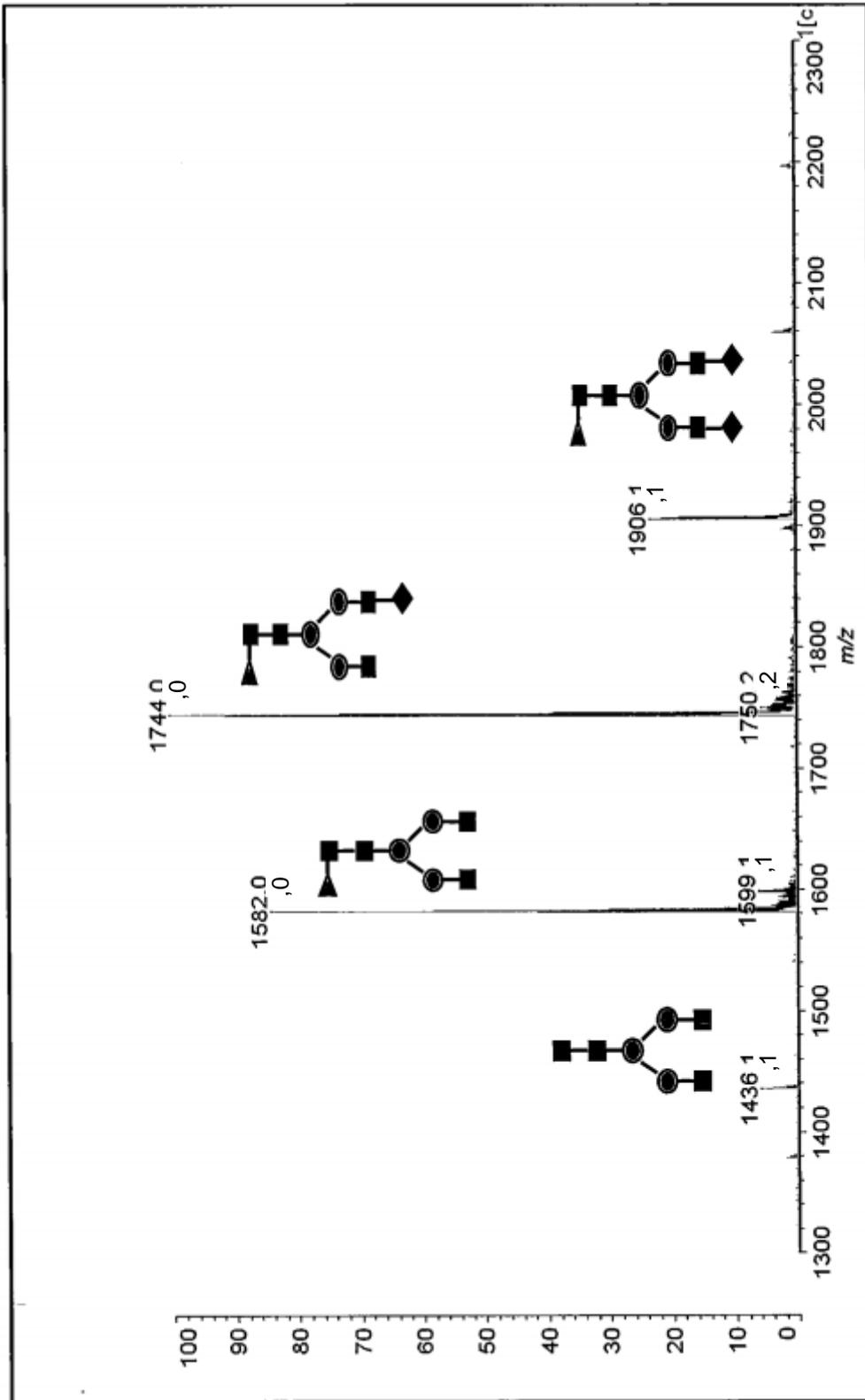


Figura 11

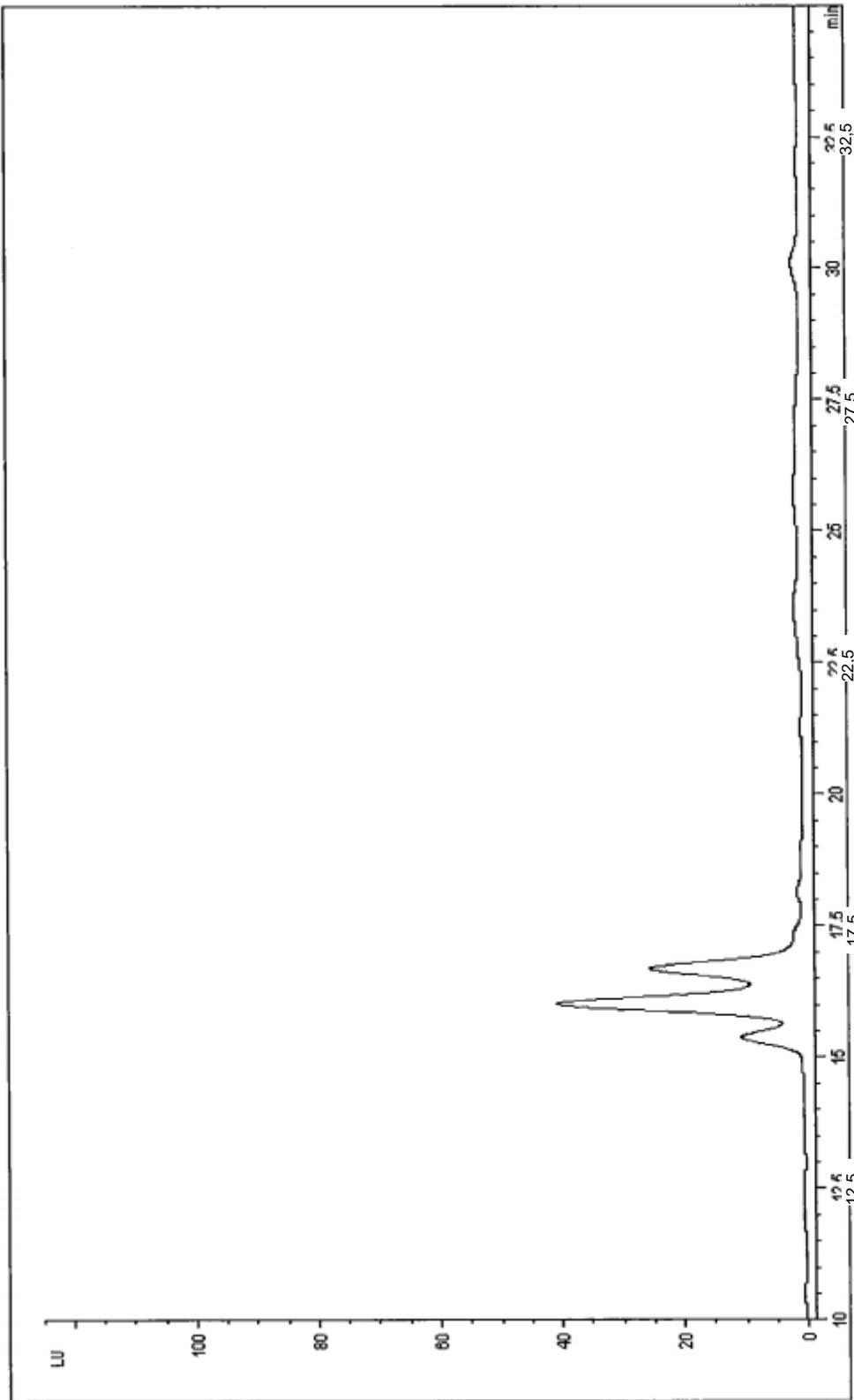


Figura 12

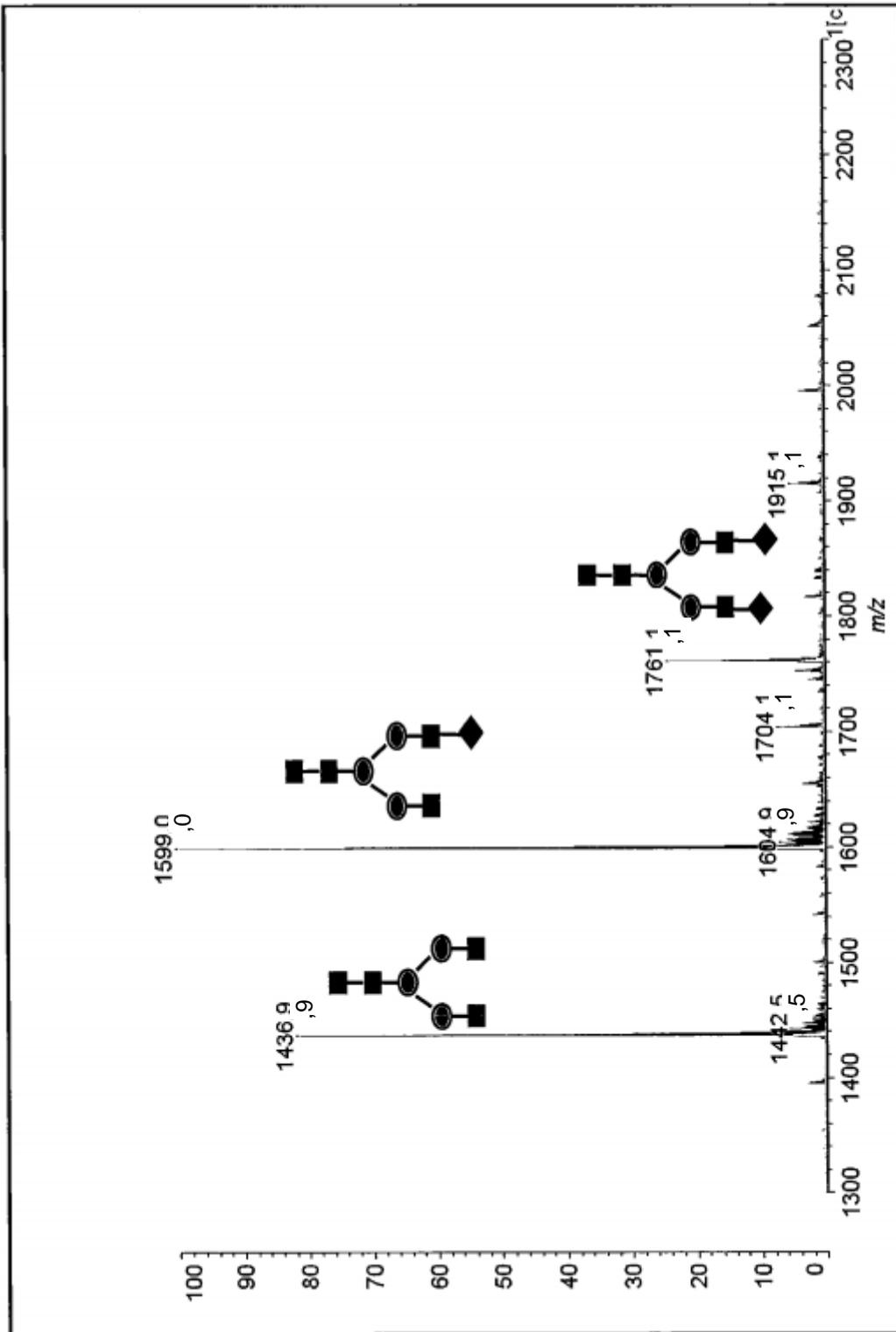


Figura 13

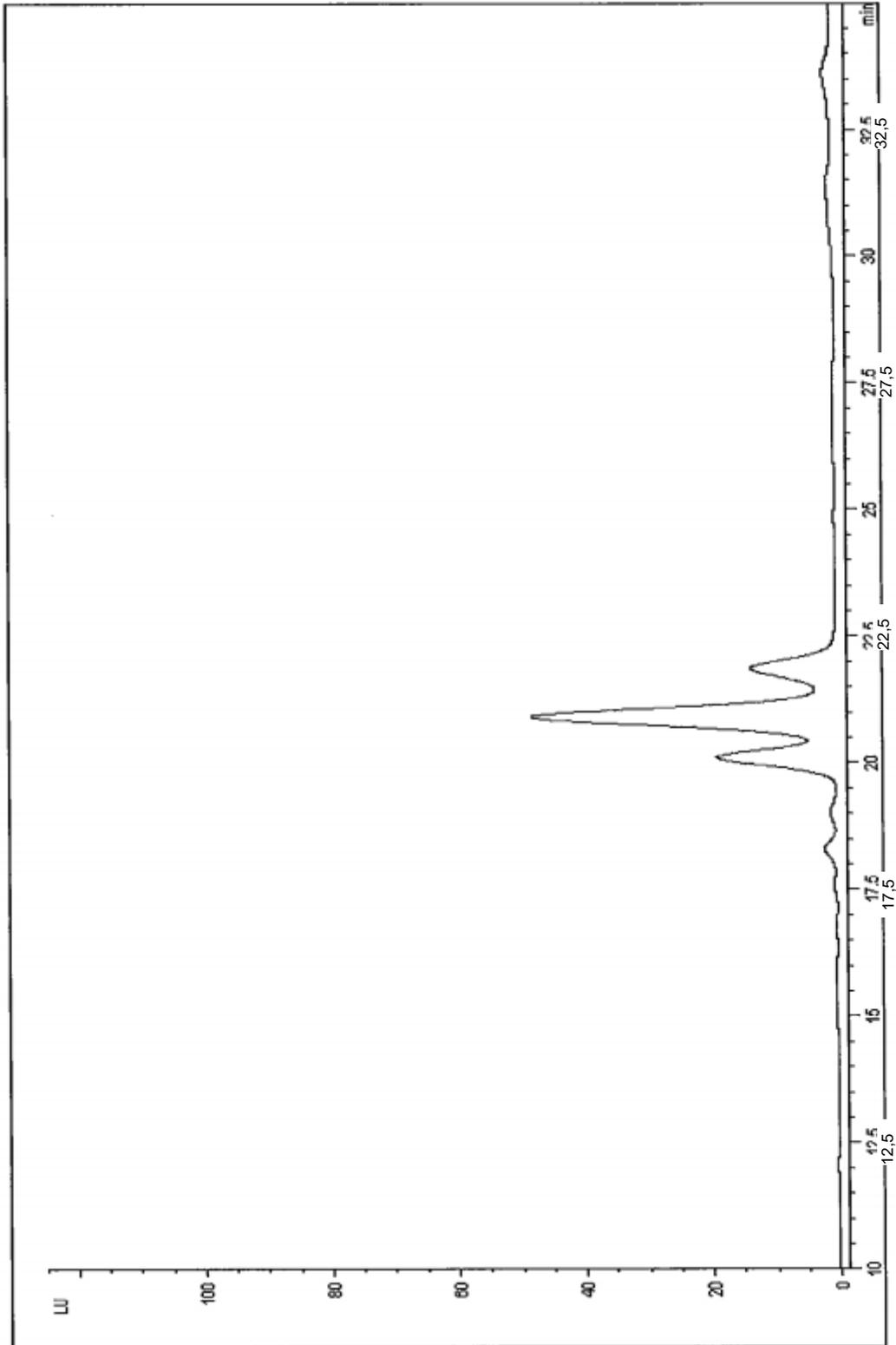


Figura 14

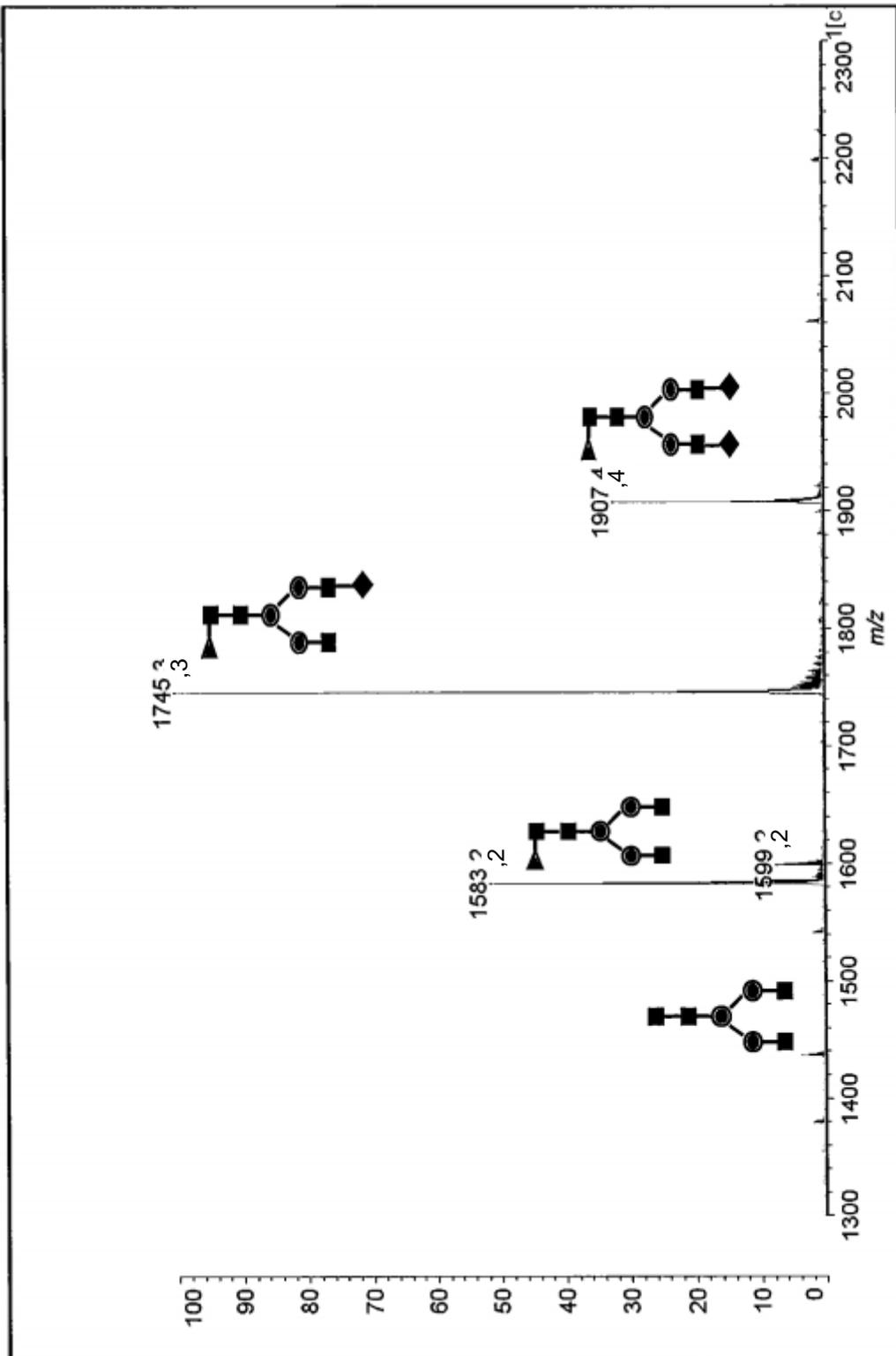


Figura 15

| Forma del glicano | % de Anticuerpo |              |            |              | Fórmula del glicano                                                                  | Estructura del glicano |
|-------------------|-----------------|--------------|------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|                   | Ac 3.1          |              | Ac 3.2     |              |                                                                                      |                        |
|                   | Sin Fucosa      | 10 mM Fucosa | Sin Fucosa | 10 mM Fucosa |                                                                                      |                        |
| G0                | 45,73           | 2,12         | 32,12      | 1,48         | (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>                       |                        |
|                   | 43,93           | 2,26         | 49,53      | 2,29         | (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>1</sub>    |                        |
|                   | 8,88            | 0,40         | 12,69      | 0,61         | (GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>2</sub>    |                        |
| G1                | 0,43            | 30,2         | 1,45       | 17,48        | Fuc(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>                    |                        |
|                   | 0,54            | 51,24        | 2,01       | 57,74        | Fuc(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>1</sub> |                        |
|                   | 0,50            | 13,78        | 2,27       | 20,41        | Fuc(GlcNAc) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> (Gal) <sub>2</sub> |                        |

Figura 16