

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 169**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/US2014/023924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14775649 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2971040**

54 Título: **Métodos de cultivo de células**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201313829333

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

02.01.2019

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC (100.0%)
301 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

PRENTICE, HOLLY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 695 169 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

Métodos de cultivo de células

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere en general a métodos de cultivo celular.

10 ANTECEDENTES

[0002] Los polipéptidos terapéuticos son una clase importante de productos de biotecnología terapéuticos, y anticuerpos terapéuticos (incluyendo murinos, anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos y fragmentos de los mismos) forman la mayoría de los productos biológicos terapéuticos.

15 **[0003]** El documento WO 2008/154014 describe un método para cultivar células de mamíferos para mejorar la producción de proteínas recombinantes.

[0004] El documento US 6673575 describe un método para preparar polipéptidos con la glicosilación apropiada.

20 SUMARIO

[0005] La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/instancias de la presente divulgación que constituyen la invención se definen mediante las reivindicaciones.

25 **[0006]** De acuerdo con la reivindicación 1, la presente invención se refiere a un método de producción de una preparación de proteína recombinante que tiene un valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula genéticamente diseñada para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina y, opcionalmente, que comprende además una o más de lisina, amonio, DMSO, cobre, glucosa, un factor de crecimiento, una vitamina, un lípido y una peptona, en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula que cumpla con un valor diana, en relación con los glicanos totales, de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados, en donde (i) el valor diana de los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados es un nivel al menos un 10% más alto que un nivel, en relación con los glicanos totales, de los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula. el medio que no comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina; (ii) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos un 10% más bajo que el nivel, en relación con los glicanos totales, de los glicanos con alto contenido de manosa en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no contenga 0,1 mg/L a 10 mg/L putrescina; (iii) el valor diana de los glicanos fucosilados es de 70% a 100% de glicanos fucosilados; (iv) el valor diana de los glicanos galactosilados es del 1% al 95% de glicanos galactosilados; (v) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1% al 20% de los glicanos con alto contenido de manosa; y/o (vi) el valor diana de los glicanos sialilados es de 0,1% a 90% de glicanos sialilados; y, opcionalmente, (d) evaluar el nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en la preparación de proteínas recombinantes; y/o, (e) formular la preparación en un producto farmacológico.

50 **[0007]** En un aspecto, la divulgación presenta un método de producción de una preparación de proteína recombinante que tiene un valor diana de glicanos uno o más maduros, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula manipulada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, suplementado con) putrescina en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; (c) recolectar (por ejemplo, purificar o aislar de la célula y/o el medio de cultivo) una preparación de la proteína recombinante producida por la célula; y (d) medir un nivel de uno o más glicanos maduros, en donde la preparación tiene el valor diana de uno o más glicanos maduros. En algunos casos, el medio de cultivo comprende putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para modificar (por ejemplo, aumentar o disminuir) uno o más glicanos maduros de la proteína recombinante.

60 **[0008]** En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L,

aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

5 **[0009]** En algunos casos, el valor diana es un nivel de uno o más glicanos maduros en un producto terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es el nivel de uno o más glicanos maduros en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es una especificación predeterminada del producto farmacéutico o un criterio de control de calidad para una preparación farmacéutica, por ejemplo, un certificado de análisis (CofA), un Certificado de prueba (CofT) o un registro maestro de lotes. En algunos casos, la especificación del producto es una descripción del producto en una etiqueta de la FDA, un folleto del médico, una monografía USP o una monografía EP.

15 **[0010]** En algunos casos, el producto terapéutico de referencia se selecciona de entre el grupo que consiste en: abatacept, abciximab, adalimumab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, rilonacept, rituximab, tositumomab y trastuzumab.

20 **[0011]** En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) más de aproximadamente 30% de glicanos maduros, por ejemplo, más de aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más, glicanos maduros; y (b) menos de aproximadamente 90% de manosa alta, glicanos híbridos, o combinación de alta manosa e glicanos híbridos, por ejemplo, menos de aproximadamente 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, o menos, glicanos de alto contenido de manosa, glicanos híbridos, o una combinación de glicanos de alto contenido de manosa e híbridos. En algunos casos, el glicano maduro es uno o más de los glicanos galactosilados y los glicanos sialilados. En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de glicanos galactosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de glicanos galactosilados; y (b) aproximadamente 0,1% a aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de glicanos sialilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

35 **[0012]** En algunos casos, el valor diana de la uno o más glicanos maduros es mayor que un nivel correspondiente en una preparación producida por cultivo de la célula en el medio que no comprende putrescina. En algunos casos, el valor diana es más alto que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más del nivel correspondiente.

40 **[0013]** En algunos casos, el método comprende además la evaluación del nivel de uno o más glicanos maduros en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, certificado de prueba (CofT) o certificado de análisis (CofA).

45 **[0014]** En otro aspecto, la divulgación presenta un método para aumentar un nivel de uno o más glicanos maduros en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula manipulada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende putrescina (por ejemplo, un nivel elevado de putrescina, por ejemplo, suplementado con putrescina) en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula; y (d) medir un nivel de uno o más glicanos maduros. En algunos casos, el medio de cultivo comprende putrescina (por ejemplo, el nivel elevado de putrescina) durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar uno o más glicanos maduros de la proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además el procesamiento (por ejemplo, uno o más de la formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más glicanos maduros.

55 **[0015]** En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

[0016] En algunos casos, el método comprende además la medición de un nivel de uno o más glicanos maduros en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

[0017] En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) más de aproximadamente 30% de glicanos maduros, por ejemplo, más de aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más, glicanos maduros; y (b) menos de aproximadamente 90% de manosa alta, glicanos híbridos, o combinación de alta manosa e glicanos híbridos, por ejemplo, menos de aproximadamente 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, glicanos de alto contenido de manosa, glicanos híbridos, o una combinación de glicanos de alto contenido de manosa e híbridos del 10% o menos. En algunos casos, el glicano maduro es uno o más de los glicanos galactosilados y los glicanos sialilados. En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de glicanos galactosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de glicanos galactosilados; y (b) aproximadamente 0,1% a aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de glicanos sialilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

[0018] En otro aspecto, la divulgación presenta un método de producción de una preparación de proteína recombinante que tiene un valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula genéticamente diseñada para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (p. ej., suplementado con) putrescina en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar (p. ej., purificar o aislar de la célula y/o del medio de cultivo) una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene el valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa, y glicanos sialilados. En algunos casos, el medio de cultivo comprende putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para modificar (por ejemplo, aumentar o disminuir) uno o más de los glicanos fucosilados, galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados de la proteína reclinante. .

[0019] En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L putrescina, En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

[0020] En algunos casos, el valor diana es un nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es una especificación predeterminada del producto farmacéutico o un criterio de control de calidad para una preparación farmacéutica, por ejemplo, un Certificado de análisis (CofA), un Certificado de prueba (CofT) o un Registro maestro de lotes. En algunos casos, la especificación del producto es una descripción del producto en una etiqueta de la FDA, un folleto del médico, una monografía USP o una monografía EP.

[0021] En algunos casos, el producto terapéutico de referencia se selecciona de entre el grupo que consiste en: abatacept, abciximab, adalimumab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, rilonacept, rituximab, tositumomab y trastuzumab.

[0022] En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) al menos aproximadamente 70% a aproximadamente 100% de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% de glicanos fucosilados; (b) al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de glicanos galactosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, glicanos galactosilados al 70%, 80%, 90% o 95%; (c) de al menos aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% de glicanos de alto contenido de manosa, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%,

glicanos de alto contenido de manosa; y (d) al menos aproximadamente 0,1% a aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de glicanos sialilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

[0023] En algunos casos, el valor diana del uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados es mayor que un nivel correspondiente en una preparación producida por cultivo de la célula en el medio que no comprende putrescina. En algunos casos, el valor diana es más alto que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más del nivel correspondiente.

[0024] En algunos casos, el valor diana de los glicanos de alto contenido de manosa es inferior a un nivel correspondiente en una preparación producida por cultivo de la célula en el medio que no comprende putrescina. En algunos casos, el valor diana es más bajo que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del nivel correspondiente.

[0025] En algunos casos, el método comprende además la evaluación del nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

[0026] En otro aspecto, la divulgación presenta un método de producción de una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar un valor diana de una o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados; (b) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante; (c) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, suplementado con) putrescina en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; (d) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula; y (e) procesar (p. ej., uno o más de formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa, y glicanos sialilados. En algunos casos, el medio de cultivo comprende putrescina por un tiempo y en una cantidad efectiva para modificar (por ejemplo, aumentar o disminuir) uno o más de los glicanos fucosilados, galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados de la proteína recombinante.

[0027] En algunos casos, el método comprende además la evaluación del nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes o Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

[0028] En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

[0029] En algunos casos, el valor diana es un nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor diana es una especificación predeterminada del producto farmacéutico o un criterio de control de calidad para una preparación farmacéutica, por ejemplo, un Certificado de análisis (CofA), un Certificado de prueba (CofT) o un Registro maestro de lotes. En algunos casos, la especificación del producto es una descripción del producto en una etiqueta de la FDA, un folleto del médico, una monografía USP o una monografía EP.

[0030] En algunos casos, el producto terapéutico de referencia se selecciona de entre el grupo que consiste en: abatacept, abciximab, adalimumab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab,

muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, rilonacept, rituximab, tositumomab y trastuzumab.

5 **[0031]** En algunos casos, el valor diana es uno o más de: (a) al menos aproximadamente 70% a aproximadamente 100% de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% , 95%, o 100% de glicanos fucosilados; (b) al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de glicanos galactosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente glicanos galactosilados al 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%; (c) de al menos aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% de glicanos de alto contenido de manosa, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1% , 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, glicanos de alto contenido de manosa; y (d) al menos aproximadamente 0,1% a aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30% , 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de glicanos sialilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

15 **[0032]** En algunos casos, el valor diana de uno o más glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados es mayor que un nivel correspondiente en una preparación producida por cultivo de la célula en el medio que no comprende putrescina. En algunos casos, el valor diana es más alto que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 20 350%, 400%, 450%, 500% o más del nivel correspondiente.

[0033] En algunos casos, el valor diana de los glicanos de alto contenido de manosa es inferior a un nivel correspondiente en una preparación producida por cultivo de la célula en el medio que no comprende putrescina. En algunos casos, el valor diana es más bajo que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 25 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del nivel correspondiente.

[0034] En otro aspecto, la divulgación presenta un método para aumentar un nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula por ingeniería genética para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel elevado de putrescina (por ejemplo, suplementado con putrescina) en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene un nivel incrementado de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados y glicanos sialilados en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida cultivando la célula en el medio que no comprende el nivel elevado de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende el nivel elevado de putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para aumentar uno o más de los glicanos fucosilados, los glicanos galactosilados y los glicanos sialilados de la proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además el procesamiento (por ejemplo, uno o más de la formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados.

[0035] En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a alrededor de 1 mg/L de putrescina.

55 **[0036]** En algunos casos, el método comprende además la medición de un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

60 **[0037]** En algunos casos, el aumento del nivel de uno o más glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados es más alto que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más, del nivel correspondiente. En algunos casos, el nivel aumentado es uno o más de: (a) al menos aproximadamente 70% a aproximadamente 100% de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% de glicanos fucosilados; (b) al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de glicanos galactosilados, por

ejemplo, al menos aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de glicanos galactosilados; y (c) al menos aproximadamente 0,1% a aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de glicanos sialilados.

5
[0038] En otro aspecto, la divulgación presenta un método para disminuir un nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula por ingeniería genética para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel reducido de putrescina en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene un nivel disminuido de uno o más de los glicanos fucosilados, glicanos galactosilados y glicanos sialilados en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida por el cultivo de la célula en el medio que no comprende el nivel reducido de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende el nivel reducido de putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para disminuir un nivel de uno o más de los glicanos fucosilados, galactosilados y glicanos sialilados de la proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además el procesamiento (por ejemplo, uno o más de la formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados.

10
[0039] En algunos casos, el medio comprende menos de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos de putrescina.

20
[0040] En algunos casos, el método comprende además la medición de un nivel de uno o más glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CoFT) o Certificado de análisis (CofA).

25
[0041] En algunos casos, la disminución del nivel de uno o más glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, y glicanos sialilados es más bajo que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del nivel correspondiente. En algunos casos, el nivel disminuido es uno o más de: (a) menos de aproximadamente el 100% de glicanos fucosilados, por ejemplo, menos de aproximadamente el 100%, 95%, 90%, 80%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60% o menos de glicanos fucosilados; (b) menos de al menos aproximadamente el 95% de glicanos galactosilados, por ejemplo, menos de aproximadamente el 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de glicanos galactosilados; y (c) menos de aproximadamente 90% de glicanos sialilados, por ejemplo, menos de aproximadamente 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o menos de glicanos sialilados.

35
[0042] En otro aspecto, la divulgación presenta un método para disminuir un nivel de uno o más de los glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula manipulada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel elevado de putrescina (por ejemplo, suplementado con putrescina) en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene un nivel reducido de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y glicanos G0F en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de célula en el medio que no comprende el nivel elevado de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende el nivel elevado de putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para disminuir el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F de la proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además el procesamiento (por ejemplo, uno o más de la formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F.

45
[0043] En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L,

aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

5 **[0044]** En algunos casos, el método comprende además la medición de un nivel de uno o más de los glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

10 **[0045]** En algunos casos, la disminución del nivel de uno o más glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F es menor que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más, del nivel correspondiente. En algunos casos, el nivel disminuido es uno o más de: (a) menos de aproximadamente 20% de glicanos de alto contenido de manosa, por ejemplo, menos de aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, o menos, glicanos con alto contenido de manosa; y (b) menos de aproximadamente 90% de glicanos G0F, por ejemplo, menos de aproximadamente 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos de glicanos G0F. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

20 **[0046]** En otro aspecto, la divulgación presenta un método para aumentar un nivel de uno o más de los glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula manipulada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel reducido de putrescina en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene un nivel incrementado de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y glicanos G0F en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida cultivando la célula en el medio que no comprende el nivel reducido de putrescina. En algunos casos, el medio de cultivo comprende un nivel reducido de putrescina durante un tiempo y en una cantidad efectiva para aumentar el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F de la proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además el procesamiento (por ejemplo, uno o más de la formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F.

35 **[0047]** En algunos casos, el medio comprende menos de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos de putrescina.

40 **[0048]** En algunos casos, el método comprende además la medición de un nivel de uno o más de los glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F en la preparación de proteína recombinante. En algunos casos, el método comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por computadora, por ejemplo, en un informe de prueba, hoja de datos de seguridad del material (MSDS), registro de lotes, Certificado de prueba (CofT) o Certificado de análisis (CofA).

45 **[0049]** En algunos casos, el aumento del nivel de uno o más glicanos de alto contenido de manosa y glicanos G0F es más alto que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más, del nivel correspondiente. En algunos casos, el nivel incrementado es uno o más de: (a) más de aproximadamente 0,1% de glicanos de alto contenido de manosa, por ejemplo, más de aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% o más, glicanos con alto contenido de manosa; y (b) más de aproximadamente 1% de glicanos G0F, por ejemplo, más de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40% o más, glicanos G0F.

55 **[0050]** En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de cultivo comprende una primera etapa y una segunda etapa. En algunos casos, la primera etapa comprende cultivar la célula en el medio de cultivo que comprende un primer nivel de putrescina, y la segunda etapa comprende cultivar la célula en el medio de cultivo que comprende un segundo nivel de putrescina. En algunos casos, el primer nivel comprende un nivel reducido de (por ejemplo, no comprende) putrescina en relación con el segundo nivel, y el segundo nivel comprende un nivel elevado de putrescina en relación con el primer nivel. En algunos casos, el primer nivel comprende un nivel elevado de putrescina, y el segundo nivel comprende un nivel reducido de (por ejemplo, no comprende) putrescina.

65 **[0051]** En algunos casos, la primera etapa comprende cultivar la célula en el primer nivel de putrescina durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 días, por ejemplo, 1-7, 1-6, 1-5 días. En algunos casos, la segunda etapa comprende cultivar la célula en el segundo nivel de putrescina durante aproximadamente 1 a aproximadamente 12 días, por ejemplo, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6 días. En algunos casos, la primera etapa es una etapa de crecimiento. En

algunos casos, la segunda etapa es una etapa de producción.

[0052] En algunos aspectos descritos en el presente documento, el medio de cultivo comprende además una o más de lisina, cisteína, amonio, manganeso, cobalto, cobre, una peptona, glucosa, galactosa, glucosamina, glutamina, un lípido (por ejemplo, colesterol), DMSO y sulfato de dextrano.

[0053] En algunos aspectos descritos en este documento, la célula es una célula de mamífero. En algunos casos, la célula de mamífero es una célula CHO (por ejemplo, CHO-K1, DG44, CHO-DXB11, CHOK1SV, CHO-S) Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK o HEK-293.

[0054] En algunos aspectos descritos en el presente documento, la proteína recombinante es un producto terapéutico recombinante. En algunos casos, la proteína recombinante es un producto de anticuerpo terapéutico recombinante. En algunos casos, la proteína recombinante es una proteína de fusión terapéutica recombinante. En algunos casos, la proteína recombinante es abatacept, abciximab, adalimumab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, riloncept, rituximab, tositumomab y trastuzumab.

[0055] En algunos aspectos descritos en el presente documento, las condiciones en que las células (por ejemplo, células de mamífero) expresan proteínas recombinantes comprenden (i) un medio que tiene un pH de aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8; (ii) una temperatura de aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 39°C, o aproximadamente 40°C; y/o (iii) un volumen de cultivo de aproximadamente 100 mL, aproximadamente 200 mL, aproximadamente 300 mL, aproximadamente 400 mL, aproximadamente 500 mL, aproximadamente 600 mL, aproximadamente 700 mL, aproximadamente 800 mL, aproximadamente 900 mL, aproximadamente 1 L, aproximadamente 2 L, aproximadamente 3 L, aproximadamente 5 L, aproximadamente 10 L, aproximadamente 20 L, aproximadamente 30 L, aproximadamente 40 L, aproximadamente 50 L, aproximadamente 100 L, aproximadamente 200 L, aproximadamente 300 L, aproximadamente 400 L, aproximadamente 500 L, aproximadamente 600 L, aproximadamente 700 L, aproximadamente 800 L, aproximadamente 900 L, aproximadamente 1000 L, 5.000 L, 10.000 L, 20.000 L, o más.

[0056] En otro aspecto, la divulgación presenta una preparación de una proteína recombinante producida utilizando un método descrito en este documento.

[0057] En otro aspecto, la divulgación presenta un método de producción de una preparación de anticuerpo terapéutico recombinante (por ejemplo, abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tositumomab o trastuzumab), comprendiendo el método: (a) proporcionar un valor diana (por ejemplo, una especificación de producto farmacéutico predeterminado o un criterio de control de calidad para una preparación farmacéutica, por ejemplo, un Certificado de análisis (CofA), un Certificado de prueba (CofT) o un Registro maestro de lotes de un producto de anticuerpo terapéutico de referencia) de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa (por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9, o combinaciones de los mismos), y glicanos sialilados; (b) proporcionar una célula CHO modificada por ingeniería genética para expresar un anticuerpo recombinante; (c) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende putrescina (por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina) en condiciones en las que la célula expresa el anticuerpo recombinante; (d) recolectar (por ejemplo, purificar o aislar de la célula y/o el medio de cultivo) una preparación del anticuerpo recombinante producido por la célula; y (e) formular (p. ej., uno o más de formulación, llenado en un recipiente, etiquetado, envasado) de la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa, y glicanos sialilados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0058] Las presentes enseñanzas descritas en este documento se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de varios ejemplos ilustrativos, cuando se lean junto con los dibujos que se acompañan. Debe entenderse que los dibujos que se describen a continuación son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

FIG. 1 es una ilustración esquemática de una molécula de anticuerpo IgG.

FIG. 2 es una representación gráfica de los niveles de glicanos fucosilados en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en un medio que tiene diferentes niveles de putrescina.

FIG. 3 es una representación gráfica de los niveles de glicano G0F, G1F y G2F en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en un medio que tiene diferentes niveles de putrescina.

FIG. 4 es una representación gráfica de los niveles totales de glicanos con alto contenido de manosa y los niveles de glicanos sialilados en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en un medio que tiene diferentes niveles de putrescina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0059] Los inventores han descubierto que las preparaciones de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles diana de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados) pueden ser producidas a partir de células cultivadas en un medio que tiene putrescina, por ejemplo, un nivel particular de putrescina eficaz para causar dicho efecto. La presente divulgación abarca preparaciones de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados), métodos para fabricar tales polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) y métodos de uso tales polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos).

Definiciones

[0060] Como se usa en el presente documento, "purificado" (o "aislado") se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) o una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un polipéptido) que está sustancialmente libre de otros componentes. En algunos casos, un polinucleótido purificado o un polipéptido purificado se elimina o se separa de otros componentes presentes en su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido aislado es uno que se separa de otros componentes de una célula en la que se produjo (por ejemplo, el retículo endoplásmico o proteínas citoplásmicas y ARN). Un polinucleótido aislado es uno que está separado de otros componentes nucleares (p. ej., Histonas) y/o de secuencias de ácidos nucleicos en sentido ascendente o descendente. Una secuencia aislada de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos puede estar libre al menos en un 60%, o al menos libre en un 75%, o libre al menos en un 90%, o libre al menos en un 95% de otros componentes presentes en el entorno natural de la secuencia de ácido nucleico indicada o secuencia de aminoácidos.

[0061] Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" (o "secuencia de nucleótidos" o "molécula de ácido nucleico") se refiere a un oligonucleótido, nucleótido, o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN y ARN de origen genómico o origen sintético, que puede ser de cadena simple o doble, y representa la cadena sentido o antisentido.

[0062] Como se usa en el presente documento, "polipéptido" (o "secuencia de aminoácidos" o "proteína") se refiere a un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia de proteína, y fragmentos o porciones de los mismos, y a moléculas de origen natural o sintético. "Secuencia de aminoácidos" y términos similares, como "polipéptido" o "proteína", no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos indicada a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula de proteína citada.

[0063] El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad (por ejemplo, dosis) eficaz en el tratamiento de un paciente, que tiene un trastorno o condición descrita en el presente documento. También debe entenderse en el presente documento que una "cantidad farmacéuticamente eficaz" puede interpretarse como una cantidad que proporciona un efecto terapéutico deseado, ya sea tomada en una dosis o en cualquier dosis o vía, tomada sola o en combinación con otros agentes terapéuticos.

[0064] El término "tratamiento" o "tratar", como se usa aquí, se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, de manera, y/o modo eficaz para mejorar una condición, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o afección o para prevenir o reducir la progresión de un trastorno o afección, en un grado detectable para un experto en la materia. Una cantidad, manera o modo efectivo puede variar según el tema y puede adaptarse al sujeto.

[0065] Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en este documento como VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en este documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos (por ejemplo, anticuerpos de cadena simple, Fab, F(ab')₂, Fd, Fv y fragmentos de dAb), así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. En algunos casos, un anticuerpo incluye una región Fc. En algunos casos, un anticuerpo es un anticuerpo terapéutico.

[0066] Tal como se utiliza aquí, el término "región Fc" se refiere a un dímero de dos "polipéptidos Fc", cada uno "polipéptido Fc" que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de la región constante de inmunoglobulina. En algunos casos, una "región Fc" incluye dos polipéptidos Fc unidos por uno o más enlaces disulfuro, enlazadores químicos o enlazadores peptídicos. "Polipéptido Fc" se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y también puede incluir parte o la totalidad de la bisagra N-terminal flexible para estos dominios. Para IgG, el "polipéptido Fc" comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 (Cγ2) y Cgamma3 (Cγ3) y la parte inferior de la bisagra entre Cgamma1 (Cγ1) y Cγ2. Aunque los límites del polipéptido Fc pueden variar, el polipéptido Fc de la cadena pesada de la IgG humana generalmente se define para comprender los residuos que comienzan en T223 o C226 o P230, hasta su término carboxilo, en donde la numeración es según el índice de la UE como en Kabat et al. (1991, NIH Publicación 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA). Para IgA, el polipéptido Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Calpha2 (Cα2) y Calpha3 (Cα3) y la parte inferior de la bisagra entre Calpha1 (Cα1) y Cα2. Una región Fc puede ser sintética, recombinante, o generada a partir de fuentes naturales como la IVIG.

[0067] Tal como se utiliza aquí, un "glicano" es un azúcar. Los glicanos pueden ser monómeros o polímeros de residuos de azúcar, pero típicamente contienen al menos tres azúcares, y pueden ser lineales o ramificados. Un glicano puede incluir residuos naturales de azúcar (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido neuramínico N-acetilo, galactosa, manosa, fucosa, hexosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, 2'-desoxirribosa, fosfomanosa, 6'-sulfo N-acetilglucosamina, etc.). El término "glicano" incluye homopolímeros y heteropolímeros de residuos de azúcar. El término "glicano" también abarca un componente de glucano de un glucoconjugado (por ejemplo, de una glicoproteína, glicolípido, proteoglicano, etc.). El término también abarca los glicanos libres, incluidos los glicanos que se han dividido o liberado de otro modo a partir de un glucoconjugado.

[0068] Como se usa en este documento, un "glicano de alto contenido de manosa" se refiere a un glicano que incluye al menos 3 residuos de azúcar de manosa y que termina en una manosa en un extremo no reductor del glicano. En algunos casos, un "glicano con alto contenido de manosa" incluye al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de azúcar de manosa.

[0069] Tal como se utiliza aquí, un "glicano sialilado" se refiere a un glicano que incluye al menos 1 ácido siálico. En ciertas ocasiones, un glicano sialilado incluye al menos 1, 2, 3 o 4 ácidos siálicos. En algunos casos, un glicano sialilado es un glicano monosialilado (por ejemplo, un glicano ramificado monosialilado en un brazo α1-3 del glicano ramificado (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc-α2,6-Gal)), y/o un glicano desialilado (por ejemplo, un glicano ramificado sialilado en un brazo α1-3 y un brazo α1-6 del glicano ramificado).

[0070] Como se usa en este documento, un "glicano galactosilado" se refiere a un glicano que incluye al menos 1 residuo de azúcar de galactosa. En algunos casos, un glicano galactosilado es un glicano G1, G2, G1F, G2F, A1 y/o A2. En algunos casos, un glicano galactosilado incluye una o más repeticiones de lactosamina. En algunos casos, un glicano galactosilado es un glicano que contiene galactosa-alfa-1-3-galactosa. En algunos casos, un glicano galactosilado es un glicano de tres antenas o un glicano de tres antenas.

[0071] Tal como se utiliza aquí, un "glicano maduro" se refiere a un glicano que incluye al menos un residuo de azúcar, además de una estructura de pentasacárido de núcleo, y no incluye más de tres residuos de azúcar de manosa. En algunos casos, un glicano maduro incluye una estructura de pentasacárido central y al menos una N-acetilglucosamina. Para claridad, los glicanos de alto contenido de manosa y los glicanos híbridos no son glicanos maduros.

[0072] Tal como se utiliza aquí, el término "preparación glicoproteína" se refiere a un conjunto de moléculas de glicoproteína individuales, cada uno de los cuales comprende un polipéptido que tiene una secuencia particular de aminoácidos (cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un sitio de glicosilación) y al menos un glucano unido covalentemente a al menos un sitio de glicosilación. Las moléculas individuales de una glicoproteína particular dentro de una preparación de glicoproteína tienen típicamente secuencias de aminoácidos idénticas pero pueden diferir en la ocupación de al menos un sitio de glicosilación y/o en la identidad de los glicanos unidos a al menos uno de los sitios de glicosilación. Es decir, una preparación de glicoproteína puede contener solo una glicofoma única de una glicoproteína particular, pero más típicamente contiene una pluralidad de glicofomas. Diferentes preparaciones de la misma glicoproteína pueden diferir en la identidad de las glicofomas presentes (por ejemplo, una glicofoma que está presente en una preparación puede estar ausente de otra) y/o en las cantidades relativas de diferentes glicofomas.

[0073] El término "glicofoma" se utiliza aquí para referirse a una forma particular de una glicoproteína. Es decir, cuando una glicoproteína incluye un polipéptido particular que tiene el potencial de estar vinculado a diferentes glicanos o conjuntos de glicanos, entonces cada versión diferente de la glicoproteína (es decir, cuando el polipéptido está vinculado a un glicano o conjunto de glicanos en particular) referido como una "glicofoma".

[0074] La "glicoproteína de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína que

tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos (por ejemplo, que tiene aproximadamente 95-100% de aminoácidos idénticos de) como una glicoproteína descrita en el presente documento, por ejemplo, una glicoproteína a la que se compara. En algunos casos, una glicoproteína de referencia es una glicoproteína terapéutica descrita en el presente documento, por ejemplo, una glicoproteína terapéutica aprobada por la FDA.

[0075] Como se usa en este documento, un "sitio de N-glicosilación de una región Fc" se refiere a un residuo de aminoácido dentro de una región Fc a la se N-vincula un glicano.

[0076] "Valor diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel predeterminado de uno o más glicanos particulares, tales como glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados. En algunos casos, un valor diana es un valor absoluto. En algunos casos, un valor diana es un valor relativo. En algunos casos, un valor diana es un nivel de uno o más glicanos particulares, como los glicanos con alto contenido de manosa (por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM8, HM8 o combinaciones), glicanos fucosilados (por ejemplo, G0F, G1F, G2F o combinaciones), glicanos galactosilados (por ejemplo, G1, G2, G1F, G2F, A1, A2 o combinaciones) y/o glicanos sialilados (por ejemplo, monosialilados, desialilados o combinaciones), en un producto de glicoproteína de referencia o descrito en una especificación o registro de lote maestro para un producto farmacéutico.

[0077] En algunos casos, un valor diana se refiere a un nivel absoluto de (por ejemplo, número de moles de) uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos de alto contenido de manosa (por ejemplo, una o más especies de glicanos de alto contenido de manosa), glicanos fucosilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos fucosilados), glicanos galactosilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos galactosilados) y/o glicanos sialilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos sialilados) en una preparación de glicoproteína. Un valor diana se refiere a un nivel de uno o más glicanos (p. ej., glicanos de alto contenido de manosa (p. ej., una o más especies de glicanos de alto contenido de manosa), glicanos fucosilados (p. ej., una o más especies de glicanos fucosilados), glicanos galactosilados (p. ej., una o más especies de glicanos galactosilados) y/o glicanos sialilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos sialilados) en una preparación de glicoproteína en relación con el nivel total de glicanos en la preparación de glicoproteína. En algunos casos, un valor diana se expresa como un "por ciento", que se refiere al número de moles de uno o más glicanos (p. ej., glicanos Fc) en relación con los moles totales de glicanos (p. ej., glicanos Fc) en una preparación de glicoproteína. En algunos casos, "porcentaje" se refiere al número de moles de uno o más glicanos Fc liberados con PNGasa F en relación con el total de moles de glicanos Fc liberados con PNGasa F detectados.

Células

[0078] Cualquier célula huésped que puede ser utilizada para expresar un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) se puede utilizar en los métodos descritos en el presente documento. Las células pueden modificarse genéticamente para contener una secuencia de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, un gen, que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Por ejemplo, las células útiles pueden expresar un polipéptido recombinante. La expresión recombinante de un gen que codifica un polipéptido puede incluir la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido, se puede producir un vector para la producción del polipéptido mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas conocidas en la técnica. Se pueden usar métodos conocidos para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de polipéptidos y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

[0079] Un vector de expresión se puede transferir a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas entonces se pueden cultivar mediante técnicas convencionales, modificadas de acuerdo con la presente descripción, para producir un polipéptido recombinante. Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 5.807.715). Dichos sistemas de expresión del huésped (por ejemplo, sistemas de expresión del huésped creados por ingeniería genética) se pueden usar para producir polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) y, cuando se desee, se purifican posteriormente. Dichos sistemas de expresión del hospedador incluyen, pero no se limitan a, levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia).

[0080] Para la expresión en células huésped de mamíferos, los sistemas de expresión basados en virus pueden utilizarse (véase, por ejemplo, Logan et al, 1984, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 8: 355-359). La eficiencia de la

expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 516-544).

5 **[0081]** Además, una cepa de célula huésped se puede escoger que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en la forma específica deseada. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación post-traduccionales de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) expresado. Dichas células incluyen, por ejemplo, líneas celulares de mamíferos establecidas y líneas celulares de insectos, células animales, células fúngicas y células de levadura. Las células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, CHO, Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK-293, NIH-3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), células CRL7030, HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Ag14 y células de hibridoma. Otros ejemplos no limitativos de células huésped de animales o mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12: 555-556 y Kolkekar et al., 1997, *Biochem.*, 36: 10901-10909), CHO-DXB11 (G. Urlaub y LA Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 4216-4220. LH Graf y LA Chasin 1982, *Molec. Cell. Biol.*, 2: 93-96), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), CHO clon 13 (GEIMG, Genova, IT), clon B de CHO (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designado como ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), RR-CHOK1 designado como ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHOK1sv (Edmonds et al., *Mol. Biotech.* 34: 179-190 (2006)), CHO-S (Pichler et al., *Biotechnol. Bioeng.* 108: 386-94 (2011)), células CHO negativas de reductasa de dihidrofolato (CHO-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77: 4216), y células dp12.CHO (patente de EE.UU. n° 5.721.121); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células de riñón embrionario humano (por ejemplo, 293 células o 293 células subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL-10); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL-70); Células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL-34); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TR1 (Mather, 1982, *Ann. NY Acad. Sci.*, 383: 44-68); células MCR 5; y células FS4.

35 **[0082]** Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, las células huésped se pueden diseñar para expresar de forma estable un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo). Las células hospedadoras pueden transformarse con el ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados conocidos en la técnica, que incluyen promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación y marcadores seleccionables. Se pueden usar métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar un clon recombinante deseado. En algunos casos, una célula está modificada genéticamente para aumentar el nivel de expresión de un polipéptido endógeno, por ejemplo, aumentando la transcripción de un gen que codifica el polipéptido y/o aumentando la estabilidad del ARNm. En algunos casos, la transcripción de un gen que codifica un polipéptido aumenta al: alterar la secuencia reguladora del gen endógeno, por ejemplo, en una célula somática, por ejemplo, mediante la adición de un elemento regulador positivo, como un potenciador o un sitio de unión de ADN para un activador transcripcional; la eliminación de un elemento regulador negativo, como un sitio de unión a ADN para un represor transcripcional; y/o la sustitución de la secuencia reguladora endógena, o elementos en ella, con la de otro gen, permitiendo así que la región de codificación del gen se transcriba de manera más eficiente.

50 **[0083]** Una vez que un polipéptido descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente memoria) ha sido producido por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Por ejemplo, un anticuerpo se puede aislar y purificar seleccionando y combinando adecuadamente columnas de afinidad como la columna de Proteína A con columnas de cromatografía, filtración, ultrafiltración, salado y procedimientos de diálisis (véase, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Además, como se describe en el presente documento, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) puede fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos para facilitar la purificación. Los polipéptidos que tienen cadenas de azúcar deseadas se pueden separar con una columna de lectina por métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/30954).

60 **[0084]** De acuerdo con la presente descripción, se pueden emplear la biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se describen en la literatura (véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (DN Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (MJ Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (BD Hames & SJ Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (BD Hames & SJ Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (RI Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); B.

Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); FM Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Métodos de cultivo

[0085] En general, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles diana de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados) se pueden producir mediante el cultivo de células en medio que contiene putrescina, por ejemplo, un nivel particular y efectivo de putrescina (por ejemplo, durante una o más etapas de cultivo).

[0086] En algunos casos, las células modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido son cultivadas (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye putrescina, por ejemplo, un nivel elevado de putrescina, disminuir niveles de glicanos de alto contenido de manosa y/o glicanos G0F en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, un nivel de glicanos con alto contenido de manosa y/o glicanos G0F disminuye en relación con el (los) nivel(es) correspondiente(s) en una preparación del polipéptido producido usando el mismo medio que no incluye putrescina, por ejemplo, un nivel elevado de putrescina. En algunos casos, el nivel disminuido de glicanos con alto contenido de manosa y/o glicanos G0F es inferior al nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% del nivel correspondiente.

[0087] En algunos casos, las células manipuladas genéticamente para expresar un polipéptido son cultivadas (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye putrescina, por ejemplo, un nivel elevado de putrescina, para aumentar los niveles de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F, en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, el nivel de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F aumenta con respecto al nivel o los niveles correspondientes en una preparación del polipéptido producido usando el mismo medio que no incluye la putrescina., por ejemplo, un nivel elevado de putrescina. En algunos casos, el aumento del nivel de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F es superior al nivel correspondiente(s) en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más, del nivel correspondiente.

[0088] En algunos casos, las células manipuladas genéticamente para expresar un polipéptido son cultivadas (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye un nivel reducido de putrescina, por ejemplo, no incluye putrescina, a aumentar los niveles de glicanos de alto contenido de manosa y/o glicanos G0F en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, un nivel de glicanos con alto contenido de manosa y/o glicanos G0F aumenta con respecto al nivel o los niveles correspondientes en una preparación del polipéptido producido utilizando el mismo medio que no incluye un nivel reducido de putrescina. En algunos casos, el aumento del nivel de glicanos con alto contenido de manosa y/o glicanos G0F es superior al nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%. 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más, del nivel correspondiente.

[0089] En algunos casos, las células manipuladas genéticamente para expresar un polipéptido son cultivadas (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye un nivel reducido de putrescina, por ejemplo, no incluye putrescina, disminuir niveles de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, el nivel de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F disminuye con respecto al nivel o los niveles correspondientes en una preparación del polipéptido producido usando el mismo medio que no incluye reducción del nivel de putrescina. En algunos casos, el nivel disminuido de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos sialilados, glicanos G1F y/o glicanos G2F es inferior al nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% del nivel correspondiente.

[0090] Como se usa en el presente documento, un "nivel elevado de putrescina" significa una mayor concentración de putrescina que está presente en un medio estándar, un medio de partida, un medio utilizado en una o más etapas del cultivo, y/o en un medio en el que se produce un polipéptido. En algunos casos, la putrescina no está presente en un medio estándar y/o de inicio, un medio utilizado en una o más etapas diferentes del cultivo y/o en un medio en el que se produce un polipéptido, y un "nivel elevado" es cualquier cantidad de putrescina. Un medio puede incluir un nivel elevado de putrescina inicialmente (es decir, al comienzo de un cultivo), y/o el medio puede complementarse con putrescina para lograr un nivel elevado de putrescina en un momento o momentos en particular (por ejemplo, en una o más etapas) durante el cultivo.

[0091] En algunos casos, un nivel elevado de putrescina es un aumento de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 900%, 900%, 950%, 1.000% o más, en relación con un nivel de putrescina en un medio estándar, un medio de partida, un medio durante una o más etapas de cultivo y/o en un medio en el que se produce un polipéptido.

[0092] En algunos casos, un nivel elevado de putrescina es un aumento en el nivel de putrescina en al menos aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, o más.

[0093] En algunos casos, un nivel elevado de putrescina es de aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, o más. En algunos casos, un nivel elevado de putrescina es de aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

[0094] Como se usa en este documento, un "nivel reducido de putrescina" significa una menor concentración de putrescina que está presente en un medio estándar, un medio de partida, un medio utilizado en una o más etapas del cultivo, y/o en un medio en que se produce un polipéptido. Un medio puede incluir un nivel reducido de putrescina inicialmente (es decir, al comienzo de un cultivo), un medio puede diluirse en un momento o momentos particulares (por ejemplo, en una o más etapas) durante el cultivo para reducir el nivel de putrescina. y/o un medio puede reemplazarse con un medio que tenga un nivel reducido de putrescina en un momento u otros momentos (por ejemplo, en una o más etapas) durante el cultivo. En algunos casos, un nivel reducido de putrescina no es putrescina o ningún nivel detectable de putrescina en un medio.

[0095] En algunos casos, un nivel reducido de putrescina es una disminución de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%, en relación con un nivel de putrescina en un medio estándar, un medio de partida, un medio durante una o más etapas de cultivo, y/o en un medio en el que se produce un polipéptido.

[0096] En algunos casos, un nivel reducido de putrescina es una disminución en al menos aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, o más.

[0097] En algunos casos, un nivel reducido de putrescina es menor de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos.

[0098] Las células pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo celular conocidos en la técnica, que están modificados según la invención para incluir putrescina como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica entienden que el medio de cultivo celular se refiere a una solución nutritiva en la que se cultivan células, tales como células de animales o mamíferos. Un medio de cultivo celular generalmente incluye uno o más de los siguientes componentes: una fuente de energía (por ejemplo, un carbohidrato como la glucosa); aminoácidos; vitaminas; lípidos o ácidos grasos libres; y elementos traza, por ejemplo, compuestos inorgánicos o elementos naturales en el rango micromolar. El medio de cultivo celular también puede contener componentes adicionales, como hormonas y otros factores de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero y similares); sales (por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato); tampones (por ejemplo, HEPES); nucleósidos y bases (p. ej., adenosina, timidina, hipoxantina); antibióticos (por ejemplo, gentamicina); y agentes protectores de células (por ejemplo, un poliol Pluronic (Pluronic F68)).

[0099] En algunos casos, además de un nivel elevado o reducido de putrescina, un medio de cultivo celular incluye lisina, cisteína, amonio, manganeso, cobalto, cobre, una peptona, glucosa, galactosa, galactosamina, glucosamina, glutamina, un lípido (p. ej., colesterol), DMSO y/o sulfato de dextrano. Por ejemplo, un medio de cultivo puede incluir aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 30 g/L de lisina (por ejemplo, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L de lisina, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 8 g/L de lisina, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 7 g/L de lisina, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 6 g/L de lisina, aproximadamente 1 g/L de lisina, aproximadamente 2 g/L de lisina, aproximadamente 3 g/L de lisina, aproximadamente 4 g/L de lisina, aproximadamente 5 g/L de lisina, aproximadamente 6 g/L de lisina, aproximadamente 7 g/L de lisina, aproximadamente 8 g/L de lisina, aproximadamente 9 g/L de lisina, o aproximadamente 10 g/L de lisina, o más); aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 1 g/L de cisteína; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM de amonio (por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM de amonio, de aproximadamente 11 mM a aproximadamente 19 mM de amonio, de aproximadamente 12 mM a aproximadamente 18 mM de amonio,

de aproximadamente 13 mM a aproximadamente 17 mM de amonio, aproximadamente 14 mM a aproximadamente 16 mM, aproximadamente 10 mM de amonio, aproximadamente 11 mM de amonio, aproximadamente 12 mM de amonio, aproximadamente 13 mM de amonio, aproximadamente 14 mM de amonio, aproximadamente 15 mM de amonio, aproximadamente 16 mM de amonio, aproximadamente 17 mM de amonio, aproximadamente 18 mM de amonio, aproximadamente 19 mM de amonio, aproximadamente 20 mM de amonio, o más); aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM manganeso; aproximadamente 0,1 mg/L hasta aproximadamente 30 mg/L de cobalto; aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 mM cobre; aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 10 g/L glucosa; aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 30 g/L peptona, por ejemplo, una peptona no derivada de animales tal como soja o semilla de algodón; aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 1 mM galactosamina; aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 5 g/L glucosamina; aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% DMSO (por ejemplo, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2% DMSO, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1% DMSO, aproximadamente 1% a aproximadamente 1,5% DMSO, aproximadamente 0,6% a aproximadamente 1,4% DMSO, aproximadamente 0,7% a aproximadamente 1,3% DMSO, aproximadamente 0,8% a aproximadamente 1,2% DMSO, aproximadamente 0,9% a aproximadamente 1,1% DMSO, aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, o aproximadamente 2% de DMSO, o más), y/o aproximadamente 0,01 g/L a aproximadamente 0,1 g/L de sulfato de dextrano.

[0100] Los medios que se han preparado o están disponibles comercialmente pueden modificarse de acuerdo con la presente divulgación para su utilización en los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos no limitativos de tales medios incluyen Minimal Essential Medium (MEM, Sigma, St. Louis, Mo.); medio de Ham F10 (Sigma); medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); Medio RPMI-1640 (Sigma); medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, Utah); Power CHO2 (Lonza Inc., Allendale, NJ); y medios químicamente definidos (CD), que están formulados para tipos de células particulares, por ejemplo, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, California). El medio de cultivo adecuado para células particulares que se cultivan puede ser determinado por un experto en la técnica sin experimentación excesiva, y dicho medio puede alterarse de acuerdo con la descripción.

[0101] Condiciones de cultivo celular (incluyendo el pH, O₂, CO₂, velocidad de agitación y temperatura) adecuado para la producción celular de los polipéptidos descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos) son los que se conocen en la técnica, tales como las condiciones de lote, cultivo de células continuoo o alimentado por lotes. Por ejemplo, el pH del medio de cultivo celular generalmente se mantiene entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2.

[0102] En algunos casos, las células se cultivaron en una o más etapas, y las células se pueden cultivar en medio que tiene un nivel elevado o reducido de putrescina en una o más etapas. Por ejemplo, un método de cultivo puede incluir una primera etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel reducido de putrescina) y una segunda etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel elevado de putrescina). En algunos casos, un método de cultivo puede incluir una primera etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel elevado de putrescina) y una segunda etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel reducido de putrescina). En algunos casos, un método de cultivo incluye más de dos etapas, por ejemplo, 3, 4, 5, 6 o más etapas, y cualquier etapa puede incluir un medio que tenga un nivel elevado de putrescina o un nivel reducido de putrescina. La duración del cultivo no es limitante. Por ejemplo, un método de cultivo puede ser 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, un método de cultivo incluye al menos dos etapas. Por ejemplo, una primera etapa puede incluir el cultivo de células en un medio que tenga un nivel reducido de putrescina (por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días) y la segunda etapa puede incluir el cultivo de células en un medio que tenga un nivel elevado de putrescina (por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días).

[0103] En algunos casos, las células se cultivan en un medio inicial que tiene un nivel reducido de putrescina durante 5 días, y medio que tiene un nivel elevado de putrescina se añade al cultivo de las células en el día 6.

[0104] En algunos casos, una primera etapa del cultivo es una etapa de crecimiento. Generalmente, durante una etapa de crecimiento, un cultivo celular experimenta un período de crecimiento celular exponencial (la fase de registro) donde las células generalmente se dividen rápidamente. En algunos casos, las células se cultivan en condiciones tales que se maximiza el crecimiento celular. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar el ciclo de crecimiento y las condiciones para maximizar el crecimiento de las células huésped para una célula huésped particular sin excesiva experimentación. En algunos casos, las células se mantienen en una etapa de crecimiento durante un período de entre 1 y 10 días. En algunos casos, las células se cultivan en un medio que tiene un nivel reducido de putrescina o un nivel elevado de putrescina para toda o parte de una etapa de crecimiento.

[0105] En algunos casos, una segunda etapa del cultivo es una etapa de producción. Generalmente, durante una etapa de producción, el crecimiento celular se ha estancado o se mantiene en un nivel casi constante. Durante una etapa de producción, ha terminado el crecimiento celular logarítmico y aumenta la producción de polipéptidos. Durante este período de tiempo, un medio generalmente puede complementarse para soportar la producción continuada de polipéptidos y para lograr un producto polipeptídico deseado. En algunos casos, las células se mantienen en una etapa de producción durante un período de entre 1 y 10 días. En algunos casos, las células se

cultivan en un medio que tiene un nivel reducido de putrescina o un nivel elevado de putrescina para toda o parte de una etapa de producción.

5 **[0106]** En general, los métodos de cultivo de células se clasifican como cultivo discontinuo, cultivo continuo, y cultivo por lote alimentado. Cualquiera de estos métodos de cultivo se puede usar para cultivar células que producen polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados).

10 **[0107]** En algunos casos, polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles diana de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados) son producidos mediante el cultivo de células en medio que contiene una o más poliaminas. Tales poliaminas incluyen, sin limitación, putrescina, espermina, espermidina y cadaverina (véase, por ejemplo, Kusano et al., *Planta* 228: 367-381 (2008)). En algunos casos, las células se cultivan en un medio de cultivo que tiene un nivel elevado o un nivel reducido de una o más poliaminas.

15 *Cultivo de lotes*

20 **[0108]** En cultivo discontinuo, se añade una pequeña cantidad de solución de cultivo de siembra a un medio y las células se cultivan sin adición de un nuevo medio o la descarga de solución de cultivo durante el cultivo. Para la producción de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) utilizando un cultivo discontinuo, el medio comprende un nivel elevado o un nivel reducido de putrescina en una etapa inicial del cultivo celular.

25 **[0109]** En algunos casos, los polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) se producen por cultivo discontinuo de células que expresan el polipéptido en un medio Nivel elevado de putrescina. En algunos casos, las células se cultivan en un medio que tiene al menos 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina. En algunos casos, las células se cultivan en un medio que tiene al menos aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

40 **[0110]** En algunos casos, los polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados) se producen por cultivo en lotes de células que expresan el polipéptido en un medio que tiene un nivel reducido de putrescina. En algunos casos, las células se cultivan en un medio que tiene menos de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos de putrescina.

50 *Cultivo continuo*

55 **[0111]** El cultivo continuo es un método de cultivo en el que se añade un medio y descarga de forma continua durante el cultivo. Este método continuo incluye el cultivo de perfusión. Por ejemplo, en la producción de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) utilizando un cultivo continuo, se puede ajustar el nivel de putrescina en el medio o más etapas de cultivo para dar como resultado un nivel elevado o un nivel reducido de putrescina. En ciertos métodos, el medio de cultivo usado en una primera etapa de cultivo no incluye un nivel elevado o un nivel reducido de putrescina, sino en un punto de tiempo particular durante el cultivo continuo (como durante toda o parte de una etapa de crecimiento y/o etapa de producción), el medio agregado durante el cultivo es elevado o reducido en el nivel de putrescina.

60 **[0112]** Los niveles en algunos casos, polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles diana de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa, y glicanos sialilados) son producidos por cultivo continuo de células que expresan el polipéptido en un medio que tiene un nivel elevado de putrescina (por ejemplo, durante una o más etapas de cultivo continuo). En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene al menos aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L,

65

3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina. En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene al menos aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L de putrescina.

[0113] En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene un nivel reducido de putrescina. En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene menos de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos de putrescina.

Cultivo de lotes alimentados

[0114] El cultivo discontinuo alimentado es un método entre cultivo discontinuo y cultivo continuo. En un cultivo de alimentación discontinua, un cultivo celular se alimenta o complementa de forma continua o secuencial durante el cultivo, pero a diferencia del cultivo continuo, la descarga de la solución de cultivo no se lleva a cabo durante el cultivo. Por ejemplo, para la producción de polipéptidos (p. ej., anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) que utilizan un cultivo alimentado por lotes, el medio agregado durante una o más etapas del cultivo puede tener un nivel elevado o un nivel reducido de putrescina.

[0115] En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) se producen al agregar medio (en una o más etapas) a un cultivo alimentado por lotes de células que expresan el polipéptido suficiente para lograr (en una o más etapas) un nivel elevado de putrescina. En algunos casos, al menos aproximadamente 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L, 5,5 mg/L, 6 mg/L, 6,5 mg/L, 7 mg/L, 7,5 mg/L, 8 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L de putrescina en el cultivo el medio se logra (por ejemplo, agregando o complementando con putrescina, por ejemplo, en una o más etapas). En algunos casos, se alcanza un nivel de putrescina de al menos aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 2 mg/L, aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 3 mg/L, aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 6 mg/L, aproximadamente 6 mg/L a aproximadamente 7 mg/L, aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 8 mg/L, aproximadamente 8 mg/L a aproximadamente 9 mg/L, aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 5 mg/L, aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L, aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 0,5 mg/L, o aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 1 mg/L.

[0116] En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) se producen mediante la adición de medio (en una o más etapas) a una cultivo de alimentación discontinua de células que expresan el polipéptido suficiente para lograr (en una o más etapas) un nivel reducido de putrescina. En algunos casos, se alcanza menos de aproximadamente 10 mg/L, 9,5 mg/L, 9 mg/L, 8,5 mg/L, 8 mg/L, 7,5 mg/L, 7 mg/L, 6,5 mg/L, 6 mg/L, 5,5 mg/L, 5 mg/L, 4,5 mg/L, 4 mg/L, 3,5 mg/L, 3 mg/L, 2,5 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1 mg/L, 0,9 mg/L, 0,8 mg/L, 0,7 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,4 mg/L, 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, o menos de putrescina en el medio de cultivo (en una o más etapas).

[0117] De acuerdo con la presente descripción, el cultivo de células puede llevarse a cabo en condiciones para la producción a gran o pequeña escala de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos), utilizando recipientes de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean convencionalmente para el cultivo de células de mamífero o animal. Por ejemplo, placas de cultivo de tejidos, matraces T, matraces de agitación y matraces giratorios se pueden usar a escala de laboratorio. Para el cultivo a gran escala (por ejemplo, 1 L, 10 L, 100 L, 500 L, 5000 L o más), se puede usar un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, un cultivo en botella con rodillo o un sistema de biorreactor de tanque agitado (por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. n^{os} 7.541.164 y 7.332.303).

[0118] En métodos particulares, los niveles de uno o más glicanos (glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) en una preparación de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) se monitorean durante una o más veces (por ejemplo, una o más etapas) del cultivo celular, lo que

permite el ajuste (por ejemplo, aumentar o disminuir la cantidad de putrescina en el cultivo) o posiblemente la terminación del cultivo, por ejemplo, para lograr un nivel objetivo de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tengan niveles diana de glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados).

5

Polipéptidos

[0119] En el presente documento se describen preparaciones terapéuticas de polipéptidos (p. ej., glicoproteínas) y métodos para preparar y utilizar dichas preparaciones. Las glicoproteínas incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de agentes hematológicos (incluidos, por ejemplo, eritropoyetina, factores de coagulación sanguínea, etc.), interferones, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, enzimas y hormonas. La identidad de una glicoproteína particular no pretende limitar la presente divulgación, y una preparación terapéutica descrita en el presente documento puede incluir cualquier glicoproteína de interés, por ejemplo, una glicoproteína que tenga una región Fc.

[0120] Una glicoproteína descrita en este documento puede incluir un dominio de unión diana que se une a una diana de interés (por ejemplo, se une a un antígeno). Por ejemplo, una glicoproteína, como un anticuerpo, puede unirse a un polipéptido transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando (por ejemplo, un factor de crecimiento). Las dianas moleculares ejemplares (por ejemplo, antígenos) para las glicoproteínas descritas en este documento (por ejemplo, anticuerpos) incluyen proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD11, CD19, CD20, CD22, CD25, CD33, CD34, CD40, CD52; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor EGF (EGFR, HER1, ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) o receptor HER4 (ErbB4); receptores de macrófagos tales como CRIg; factores de necrosis tumoral tales como TNF α o TRAIL/Apo-2; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina $\alpha\beta$ 3, incluidas las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti CD11b); factores de crecimiento y receptores tales como EGF, FGFR (por ejemplo, FGFR3) y VEGF; IgE; citocinas tales como IL1; receptores de citoquinas tales como el receptor de IL2; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C; neutropilinas; efrinas y receptores; netrinas y receptores; hendidura y receptores; quimiocinas y receptores de quimiocinas tales como CCL5, CCR4, CCR5; beta amiloide; factores del complemento, como el factor D del complemento; lipoproteínas, tales como LDL oxidadas (oxLDL); las linfotoxinas, como la linfotoxina alfa (LTa). Otras moleculares dianas incluyen Tweak, B7RP-1, convertasa de proproteína subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), esclerostina, c-kit, Tie-2, c-fms y anti-M1.

30

Polipéptidos de referencia

[0121] En algunos casos, se describe en el presente documento un polipéptido terapéutico (por ejemplo, glicoproteína) después de haber dirigido niveles de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados), donde los niveles previstos son los niveles de glicanos (por ejemplo, glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) en un producto polipeptídico de referencia (p. ej., producto de glicoproteína). Los productos de glicoproteínas de referencia, no limitativos, pueden incluir abatacept (Orencia®, Bristol-Myers Squibb), abcximab (ReoPro®, Roche), adalimumab (Humira®, Bristol-Myers Squibb), aflibercept (Eylea®, Regeneron Pharmaceuticals), alefacept (Amevive®, Astellas Pharma), alemtuzumab (Campath®, Genzyme/Bayer), basiliximab (Simulect®, Novartis), belatacept (Nulojix®, Bristol-Myers Squibb), belimumab (Benlysta®, GlaxoSmithKline), bevacizumab (Avastin®) Roche), canakinumab (Ilaris®, Novartis), brentuximab vedotin (Adcetris®, Seattle Genetics), certolizumab (CIMZIA®, UCB, Bruselas, Bélgica), cetuximab (Erbitux®, Merck-Serono), daclizumab (Zenapax®, Hoffmann-La Roche), denileukin diftitox (Ontak®, Eisai), denosumab (Prolia®, Amgen; Xgeva®, Amgen), eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals), efalizumab (Raptiva®, Genentech), etanercept (Enbrel®, Amgen-Pfizer), gemtuzumab (Mylotarg®, Pfizer), golimumab (Simponi®, Janssen), ibritumomab (Zevalin®, Spectrum Pharmaceuticals), infliximab (Remicade®, Centocor), ipilimumab (Yervoy™, Bristol-Myers Squibb), muromonab (Orthoclone OKT3®, Janssen-Cilag), natalizumab (Tysabri®, Biogen Idec, Elan), ofatumumab (Arzerra®, GlaxoSmithKline), omalizumab (Xolair®, Novartis), palivizumab (Synagis®, MedImmune), panitumumab (Vectibix®, Amgen), ranibizumab (Lucentis®, Genentech), rilonacept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals), rituximab, Mabtera tocilizumab (Actemra®, Genentech; RoActemra, Hoffman-La Roche) tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline) y trastuzumab (Herceptin®, Roche).

55

[0122] En algunos casos, un nivel de uno o más glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) en un producto polipeptídico de referencia se determina analizando una o más preparaciones (por ejemplo, uno o más lotes) del polipéptido de referencia. En algunos casos, un nivel de uno o más glicanos (p. ej., glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados) en un producto de polipéptidos de referencia es un rango de uno o más glicanos en dos o más preparaciones de el polipéptido de referencia (por ejemplo, dos o más lotes del producto polipeptídico de referencia). En algunos casos, un nivel de uno o más glicanos es un rango (por ejemplo, que abarca un nivel más bajo de uno o más glicanos hasta un nivel más alto de uno o más glicanos) en dos o más lotes del producto polipeptídico de referencia.

65

Glicosilación N-Vinculada

[0123] Las cadenas de oligosacáridos N-ligados se agregan a una proteína en el lumen del retículo endoplásmico (véase *Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. (Alberts y otros, 1994)). Específicamente, se agrega un oligosacárido inicial (típicamente 14-azúcar) al grupo amino en la cadena lateral de un residuo de asparagina contenido dentro de la secuencia de consenso diana de Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La estructura de este oligosacárido inicial es común a la mayoría de los eucariotas y contiene 3 residuos de glucosa, 9 manosa y 2 N-acetilglucosamina. Esta cadena de oligosacáridos inicial puede recortarse mediante enzimas glicosidasas específicas en el retículo endoplásmico, lo que da como resultado un oligosacárido de núcleo ramificado corto compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina y tres de manosa.

[0124] Los N-glicanos pueden subdividirse en tres grupos distintos denominados "tipo de manosa alta", "tipo híbrido" y "tipo complejo", con un núcleo de pentasacárido común (Man(alfa1,6)-(Man(alfa1,3))-Man(beta1,4)-GlcNAc(beta 1,4)-GlcNAc(beta 1, N)-Asn) en los tres grupos.

[0125] Después del procesamiento inicial en el retículo endoplasmático, la glicoproteína se transporta al Golgi, donde un procesamiento adicional puede tener lugar. Si el glicano se transfiere al Golgi antes de recortarlo completamente a la estructura del pentasacárido central, se obtiene un "glicano con alto contenido de manosa".

[0126] Adicional o alternativamente, se pueden agregar una o más unidades de monosacáridos de N-acetilglucosamina a las subunidades de manosa central para formar un "glicano complejo". La galactosa se puede agregar a las subunidades de N-acetilglucosamina, y las subunidades de ácido siálico se pueden agregar a las subunidades de galactosa, dando como resultado cadenas que terminan con cualquiera de un ácido siálico, una galactosa o un residuo de N-acetilglucosamina. Además, se puede agregar un residuo de fucosa a un residuo de N-acetilglucosamina del oligosacárido central. Cada una de estas adiciones está catalizada por transferasas de glucosilo específicas, conocidas en la técnica. Los ácidos siálicos son una familia de monosacáridos de 9 carbonos con estructuras de anillo heterocíclico. Llevan una carga negativa a través de un grupo de ácido carboxílico unido al anillo, así como otras decoraciones químicas, incluidos los grupos N-acetilo y N-glicolilo. Los dos tipos principales de residuos de sialilo encontrados en las glicoproteínas producidas en los sistemas de expresión de mamíferos son el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) y el ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Estos ocurren generalmente como estructuras terminales unidas a residuos de galactosa (Gal) en los extremos no reductores de los glicanos unidos por N y O. La configuración de enlace glicosídico para estos grupos sialilo puede ser α 2,3 o α 2,6.

[0128] "Glicanos híbridos" comprenden características tanto de glicanos complejos como de alto contenido en manosa. Por ejemplo, una rama de un glicano híbrido puede comprender principalmente o exclusivamente residuos de manosa, mientras que otra rama puede comprender azúcares N-acetilglucosamina, ácido siálico y/o galactosa.

Glicosilación N-ligada en anticuerpos

[0129] Los anticuerpos son glicosilados en sitios de glicosilación N-ligados conservados en las regiones Fc de cadenas pesadas de inmunoglobulina. Por ejemplo, cada cadena pesada de un anticuerpo IgG tiene un solo sitio de glicosilación unido a N en Asn297 del dominio CH2 (véase Jefferis, *Nature Reviews* 8: 226-234 (2009)). Los anticuerpos IgA tienen sitios de glicosilación N-ligados dentro de los dominios CH2 y CH3, los anticuerpos IgE tienen sitios de glicosilación N-ligados dentro del dominio CH3 y los anticuerpos IgM tienen sitios de glicosilación N-ligados dentro de los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4 (véase Arnold et al., *J. Biol. Chem.* 280: 29080-29087 (2005); Mattu et al., *J. Biol. Chem.* 273: 2260-2272 (1998); Nettleton et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 328-329 (1995)).

[0130] Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos N-ligados en las regiones constantes. Por ejemplo, la IgG tiene un solo carbohidrato biantenarico N-ligado en Asn297 del dominio CH2 en cada polipéptido Fc de la región Fc, que también contiene los sitios de unión para C1q y FcγR (véase Jefferis et al., *Immunol. Rev* 163: 59-76 (1998) y Wright et al., *Trends Biotech* 15: 26-32 (1997)). Para la IgG humana, el oligosacárido central normalmente consiste en GlcNAc₂Man₃GlcNAc, con diferentes números de residuos externos. La variación entre las IgG individuales puede ocurrir mediante la unión de galactosa y/o galactosa-ácido siálico en una o ambas GlcNAc terminales o mediante la unión de un tercer brazo de GlcNAc (bisección de GlcNAc), y/o la unión de fucosa.

Anticuerpos

[0131] La estructura básica de un anticuerpo IgG se ilustra en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, un anticuerpo IgG consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas unidas entre sí por enlaces disulfuro. El primer dominio ubicado en el extremo amino de cada cadena es variable en la secuencia de aminoácidos, proporcionando especificidades de unión al anticuerpo encontradas en cada anticuerpo individual. Estas se conocen como regiones variables pesadas (VH) y variables ligeras (VL). Los otros dominios de cada cadena son relativamente invariantes en la secuencia de aminoácidos y se conocen como regiones constantes pesadas (CH) y constantes ligeras (CL). Como se muestra en la Figura 1, para un anticuerpo IgG, la cadena ligera incluye una región variable (VL) y una región constante (CL). Una cadena pesada de IgG incluye una región variable (VH), una primera región constante (CH1), una región bisagra, una segunda región

constante (CH2) y una tercera región constante (CH3). En los anticuerpos IgE e IgM, la cadena pesada incluye una región constante adicional (CH4).

[0132] Los anticuerpos descritos en este documento pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales (por ejemplo, IVIG), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena simple (scFv), Fv unido a disulfuro (sdFv), y anticuerpos antiidiotípicos (anti-id), y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

[0133] El término "fragmento Fc", como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de una región Fc que retiene una función de Fc y/o actividad descritos en el presente documento, tales como la unión a un receptor Fc. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos que incluyen un sitio de glicosilación unido a N de una región Fc (por ejemplo, un Asn297 de una cadena pesada de IgG o sitios homólogos de otros isotipos de anticuerpos), tal como un dominio CH2. El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento scFv, un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), y una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos pueden seleccionarse para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[0134] Glicoproteínas de referencia descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos de referencia) o fragmentos de los mismos pueden ser producidos por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos) (véase, por ejemplo, Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Los anticuerpos quiméricos se pueden producir utilizando los métodos descritos en, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229: 1202, y los anticuerpos humanizados mediante los métodos descritos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.180.370.

[0135] Los anticuerpos de referencia adicionales que se describen en el presente documento son anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multivalentes, como se describe en, por ejemplo, Segal et al., J. Immunol. Methods 248: 1-6 (2001); y Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

Conjugados de glicoproteínas

[0136] La divulgación incluye glicoproteínas (o regiones Fc o fragmentos Fc que contienen uno o más sitios de N-glicosilación de los mismos) que se conjugan o fusionan a uno o más restos heterólogos. Los restos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. En algunos casos, un conjugado de glicoproteína es una proteína de fusión que comprende un péptido, polipéptido, armazón proteico, scFv, dsFv, diacuerpo, Tandab o un anticuerpo mimético fusionado a una región Fc, como una región Fc glicosilada. Una proteína de fusión puede incluir una región enlazadora que conecta una región Fc a un resto heterólogo (véase, por ejemplo, Hallelwell y otros (1989), J. Biol. Chem. 264, 5260-5268; Alfthan y otros (1995), Protein Eng. 8, 725-731; Robinson & Sauer (1996)).

[0137] Entre los productos conjugados de glicoproteína de referencia no limitativos, se incluyen abatacept (Orencia®, Bristol-Myers Squibb), aflibercept (Eylea®, Regeneron Pharmaceuticals), alefacept (Amevive®, Astellas Pharma), belatacept (Nulo-jix®, Bristol-Myers Squibb), denileukin diftotox (Ontak®, Eisai), etanercept (Enbrel®, Amgen-Pfizer) y riloncept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals).

[0138] En algunos casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilaciones del mismo) conjugada con un polipéptido heterólogo de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos.

[0139] En algunos casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilación de los mismos) conjugada con una o más secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. Una secuencia de aminoácidos marcadora particular es un péptido hexahistidina, como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311). Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA" de hemaglutinina, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., 1984, Cell 37: 767) y la etiqueta de "Bandera".

[0140] En otros casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o

más sitios de N-glicosilación de los mismos) conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Dichas proteínas de fusión pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el desarrollo o la progresión de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de prueba clínica, como la determinación de la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se puede realizar mediante el acoplamiento de una glicoproteína a sustancias detectables que incluyen, entre otras, diversas enzimas, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, como pero no limitado a yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Sn; metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos.

[0141] Las técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas (véase, por ejemplo, Arnon et al., "Mono-clonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery", en *Control Drogas Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)).

Evaluación de Glicano

[0142] En algunos casos, los glicanos de las glicoproteínas se analizan mediante cualquier método adecuado disponible. En algunos casos, la estructura y la composición del glicano como se describe en el presente documento se analizan, por ejemplo, mediante uno o más métodos enzimático, cromatográfico, cromatográfico, de espectrometría de masas (MS), cromatográfico seguido de MS, métodos electroforéticos, métodos electroforéticos seguidos de MS, métodos de resonancia magnética nuclear (RMN), y combinaciones de los mismos. Los métodos enzimáticos ejemplares incluyen la puesta en contacto de una preparación de glicoproteína con una o más enzimas en condiciones y durante un tiempo suficiente para liberar uno o más glicanos (por ejemplo, uno o más glicanos expuestos). En algunos casos, la una o más enzimas incluyen(s) PNGasa F. Los métodos cromatográficos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de intercambio aniónico fuerte que utiliza detección amperométrica pulsada (SAX-PAD), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de rendimiento ultra (UPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna de amida y combinaciones de las mismas. La espectrometría de masas (MS) ejemplar incluye, pero no se limita a, MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, espectrometría de masas de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS), espectrometría de masas transformada de Fourier (FTMS), separación de movilidad de iones con espectrometría de masas (IMS-MS), disociación de transferencia de electrones (ETD-MS) y combinaciones de los mismos. Los métodos electroforéticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, electroforesis capilar (CE), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de transferencia de Western utilizando anticuerpos que reconocen estructuras específicas de glicanos, y combinaciones de los mismos. La resonancia magnética nuclear (RMN) ejemplar incluye, pero no se limita a, RMN unidimensional (1D-RMN), RMN bidimensional (2D-RMN), espectroscopía de correlación de ángulo magnético RMN (COSY-RMN), espectroscopía de correlación total RMN (TOCSY-RMN), RMN heterogénea de coherencia cuántica monoconuclear (HSQC-RMN), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC-RMN), espectroscopía de efecto de sobrecarga nuclear RMN (ROESY-RMN), espectroscopía de efecto de sobrecarga nuclear (NOESY-RMN), y combinaciones de los mismos.

[0143] En algunos casos, las técnicas descritas en el presente documento pueden combinarse con una o más otras tecnologías para la detección, análisis, y/o el aislamiento de glicanos o glicoproteínas. Por ejemplo, en ciertos casos, los glicanos se analizan de acuerdo con la presente divulgación utilizando uno o más métodos disponibles (para dar solo algunos ejemplos, véase Anumula, *Anal. Biochem.*, 350 (1): 1, 2006; Klein y otros, *Anal. Biochem.*, 179: 162, 1989; y/o Townsend, *RR Carbohydrate Analysis" High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis.*, Ed. Z. El Rassi, pp 181-209, 1995; WO2008/128216; WO2008/128220; WO2008/128218; WO2008/130926; WO2008/130926/WO2008/130926 128225; WO2008/130924; WO2008/128221; WO2008/128228; WO2008/128227; WO2008/128230; WO2008/128219; WO2008/128222; WO2010/071817; WO2010/071824; WO2010/085251; WO2011/069056; por ejemplo, en algunos casos, los glicanos se caracterizan utilizando uno o más de los métodos cromatográficos, métodos electroforéticos, métodos de resonancia magnética nuclear y combinaciones de los mismos. En algunos casos, los glicanos se analizan marcando con un tinte fluorescente y midiendo los niveles de fluorescencia.

[0144] En algunos casos, los métodos para evaluar uno o más parámetros específicos de la proteína diana, por ejemplo, en una preparación de glicoproteína, por ejemplo, uno o más de los parámetros descritos en el presente documento, puede ser realizada por uno o más de los métodos enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1: Métodos ejemplares de evaluación de parámetros:

| Método(s) | Literatura relevante | Parámetro |
|--|---|---|
| C18 UPLC Espec.de masa* | Chen y Flynn, anal. Biochem., 370: 147-161 (2007) Chen y Flynn, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 20: 1821-1833 (2009) | Glicano(s) (p. ej., glicano N-ligado, glicano N-ligado expuesto, detección de glicano, identificación y caracterización de glicano; glucosilación específica de sitio; detección de glicoforno (p. ej., parámetros 1-7); glicosilación en porcentaje; y/o aglicosilo) |
| Bioanalizador (reductor/no reductor)* | Forrer y otros, Anal. Biochem., 334: 81-88 (2004) | Glicano (p. ej., glicano N-ligado, glicano N-ligado expuesto) (que incluye, por ejemplo, detección, identificación y caracterización de glicano; glicación específica del sitio; detección de glicoforno; porcentaje de glicosilación; y/o aglicosilo) |
| LC-MS (reductor/no reductor/alquilado)* *Los métodos incluyen la eliminación (por ejemplo, enzimática, química y física) de glicanos | Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008) Goetze et al., Glycobiol., 21: 949-959 (2011) Xie et al., MAbs, 2: 379-394 (2010) | Glicano (p. ej., glicano N-ligado, glicano N-ligado expuesto) (que incluye, por ejemplo, detección, identificación y caracterización de glicano; glicación específica del sitio; detección de glicoforno; porcentaje de glicosilación; y/o aglicosilo) |
| Cromatografía de intercambio aniónico | Ahn et al., J. Chrom. B, 878: 403-408 (2010) | Glicano sialilado |
| Método de etiquetado de 1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno (DMB) | Hokke et al., FEBS Lett., 275: 9-14 (1990) | Ácido siálico |

[0145] La literatura indicada anteriormente puede pertenecer a uno o más de los métodos para determinar un parámetro descrito en este documento.

Composiciones farmacéuticas y administración

[0146] Una glicoproteína descrita en este documento puede ser incorporada (por ejemplo, formulada) en una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica es útil como una composición alternativa y/o mejorada para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades en relación con una glucoproteína de referencia correspondiente. Las composiciones farmacéuticas que comprenden una glicoproteína se pueden formular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral en forma de una formulación inyectable que comprende una solución o suspensión estéril en agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse combinando adecuadamente la glicoproteína con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables, como agua estéril y solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, agente de suspensión, surfactante, estabilizante, excipiente saborizante, diluyente, vehículo, conservante, aglutinante, seguido de la mezcla en una forma de dosis unitaria requerida para las prácticas farmacéuticas generalmente aceptadas. La cantidad de ingrediente activo incluido en las preparaciones farmacéuticas es tal que se proporciona una dosis adecuada dentro del rango designado.

[0147] Una composición estéril para inyección puede ser formulada de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales utilizando agua destilada para inyección como vehículo. Por ejemplo, se puede usar una solución salina fisiológica o una solución isotónica que contenga glucosa y otros suplementos como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio como solución acuosa para inyección, opcionalmente en combinación con un agente solubilizante adecuado. Por ejemplo, alcohol tal como etanol y polialcohol tal como propilenglicol o polietilenglicol, y un tensioactivo no iónico tal como polisorbato 80TM, HCO-50 y similares.

[0148] Los ejemplos no limitativos de líquido aceitoso incluyen aceite de sésamo y aceite de soja, y se pueden combinar con benzoato de bencilo o alcohol bencilico como agente solubilizante. Otros elementos que pueden incluirse son un tampón como un tampón de fosfato o un tampón de acetato de sodio, un agente calmante como el clorhidrato de procaína, un estabilizante como alcohol bencilico o fenol y un antioxidante. Una inyección formulada puede envasarse en una ampolla adecuada.

[0149] En algunos casos, un nivel de uno o más glicanos descritos en este documento puede ser comparado con un nivel predeterminado (por ejemplo, un nivel correspondiente en un patrón de referencia), por ejemplo, para tomar una decisión con respecto a la composición de la preparación de polipéptido, por ejemplo, la decisión de clasificar,

seleccionar, aceptar o descartar, liberar o retener, procesar un producto farmacéutico, enviar, mudarse a una ubicación diferente, formular, etiquetar, empaquetar, liberar para el comercio u vender u ofrecer para la venta el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo recombinante. En otros casos, la decisión puede ser aceptar, modificar o rechazar un parámetro o parámetros de producción utilizados para hacer el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo. Los ejemplos particulares, no limitativos, de estándares de referencia incluyen un nivel de control (por ejemplo, un polipéptido producido por un método diferente) o un rango o valor en una especificación del producto (por ejemplo, una etiqueta de la FDA o un folleto del médico) o un criterio de calidad para una preparación farmacéutica que contiene la preparación de polipéptidos.

[0150] En algunos casos, métodos (es decir, evaluación, identificación y producción) incluyen la toma de acción (por ejemplo, la acción física) en respuesta a los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, una preparación de polipéptidos se clasifica, selecciona, acepta o desecha, libera o retiene, transformándose en un producto farmacéutico, se envía, se traslada a una ubicación diferente, se formula, se etiqueta, se empaqueta, se libera para el comercio o se vende o se ofrece para la venta, dependiendo de si se cumple el valor preseleccionado o el valor diana. En algunos casos, el procesamiento puede incluir la formulación (p. ej., combinar con excipientes farmacéuticos), envasar (p. ej., en una jeringa o vial), etiquetar o enviar al menos una porción de la preparación del polipéptido. En algunos casos, el procesamiento incluye la formulación (por ejemplo, la combinación con excipientes farmacéuticos), el empaque (por ejemplo, en una jeringa o vial) y el etiquetado de al menos una porción de la preparación como un producto farmacéutico descrito en este documento. El procesamiento puede incluir dirigir y/o contratar a otra parte para que procese como se describe en este documento.

[0151] En algunos casos, se evalúa una actividad biológica de una preparación de polipéptido (por ejemplo, una preparación de anticuerpos). La actividad biológica de la preparación se puede analizar mediante cualquier método conocido. En algunos casos, se evalúa la actividad de unión de un polipéptido (por ejemplo, la unión a un receptor). En algunos casos, se evalúa la actividad terapéutica de un polipéptido (p. ej., una actividad de un polipéptido para disminuir la gravedad o los síntomas de una enfermedad o afección, o para retrasar la aparición de un síntoma de una enfermedad o afección). En algunos casos, se evalúa la actividad farmacológica de un polipéptido (p. ej., biodisponibilidad, farmacocinética, farmacodinamia). Para los métodos de análisis de la biodisponibilidad, la farmacocinética y la farmacodinámica de los agentes terapéuticos de las glucoproteínas, véase, por ejemplo, Weiner et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (5): 571-9, 1997; Srinivas et al., J. Pharm. Sci. 85 (1): 1-4, 1996; y Srinivas et al., Pharm. Res. 14 (7): 911-6, 1997.

[0152] La actividad biológica particular o actividad terapéutica que puede ser probada variará dependiendo del polipéptido particular (por ejemplo, anticuerpo). La actividad adversa potencial o la toxicidad (p. ej., la propensión a causar hipertensión, reacciones alérgicas, eventos trombóticos, convulsiones u otros eventos adversos) de las preparaciones de polipéptidos se pueden analizar mediante cualquier método disponible. En algunos casos, se evalúa la inmunogenicidad de una preparación de polipéptidos, por ejemplo, determinando si la preparación provoca una respuesta de anticuerpos en un sujeto.

[0151] La ruta de administración puede ser parenteral, por ejemplo, administración por inyección, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transcutánea. La administración puede ser sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea.

[0154] Un medio de administración adecuado puede seleccionarse en base a la edad y condición del paciente. Una dosis única de la composición farmacéutica que contiene una glicoproteína modificada se puede seleccionar de un rango de 0,001 a 1.000 mg/kg de peso corporal. Por otro lado, se puede seleccionar una dosis en el intervalo de 0,001 a 100.000 mg/peso corporal, pero la presente descripción no se limita a tales intervalos. La dosis y el método de administración varían según el peso, la edad, el estado y similares del paciente, y los expertos en la técnica pueden seleccionarlos adecuadamente según sea necesario.

[0155] Los materiales, métodos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, métodos y materiales adecuados se describen en el presente documento.

[0156] La divulgación se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo. El ejemplo se proporciona únicamente con fines ilustrativos. No debe interpretarse como limitador del alcance o el contenido de la divulgación de ninguna manera.

EJEMPLO:

Efecto de la putrescina sobre la glicosilación.

[0157] Se analizó el efecto de putrescina en glicofomas de anticuerpos de un anticuerpo modelo producido por células CHO. Las células CHO modificadas por ingeniería genética para expresar el anticuerpo se cultivaron

inicialmente en medios básicos (Power CHO2, número de catálogo BE15-771, Lonza Inc., Allendale, NJ). A continuación, las células se inocularon (a $0,55 \times 10^6$ células/mL) en un medio definido químicamente que contenía 0,17 mg/L, 0,35 mg/L, o 0,52 g/L de putrescina 2HCl y se cultivaron como cultivo discontinuo en tubos de TPP durante 7 días.

5
[0158] La viabilidad celular se evaluó en el día 4 usando un hemocitómetro usando células teñidas con azul de tripano. El título se determinó a partir de los cultivos del día 7 por HPLC de afinidad con proteína A. La cuantificación relativa de cada glicofoma se realizó en una proteína purificada utilizando Chip ToF. Chip ToF usa espectrometría de masas para medir el área del cromatograma de iones extraído (XIC) para cada especie después de la eliminación enzimática basada en chips y la purificación de N-glicanos, en relación con el XIC total para las especies detectadas (véase, por ejemplo, el kit de chips mAb-Glyco, Agilent Technologies).

Resultados

15 [0159] El crecimiento celular y el título mostraron una respuesta a la dosis sobre 0,17 mg/L, 0,35 mg/L, y 0,52 mg/L de putrescina. Los títulos de productos de 40 mg/L, 58 mg/L y 73 mg/L se midieron a partir de células cultivadas en un medio con 0,17 mg/L, 0,35 mg/L y 0,52 mg/L de putrescina, respectivamente. En el día 4, las células cultivadas en 0,17 mg/L de putrescina tenían una densidad celular viable (VCD) de $1,5 \times 10^6$ células/mL; las células cultivadas en 0,35 mg/L de putrescina tenían un VCD de $1,8 \times 10^6$ células/mL; y las células cultivadas en 0,52 mg/L de putrescina tenían un VCD de $2,2 \times 10^6$ células/mL.

20
[0160] Como se muestra en la Figura 2, la fracción de glicanos fucosilados aumentó con el aumento de los niveles de putrescina. La relación fue no lineal, lo que sugiere una saturación para este efecto por encima de 0,35 mg/mL. La putrescina también alteró la distribución de las principales especies fucosiladas, lo que llevó a niveles reducidos de G0F y niveles aumentados de G1F y G2F (véase Figura 3). El aumento de putrescina también dio como resultado un aumento en el nivel de galactosilación. Como se muestra en la Figura 3, el cambio relativo en G0F, G1F y G2F fue de alrededor del 10% cuando se compararon 0,52 mg/L de putrescina con 0,17 mg/L de putrescina. El aumento sumado en G1F y G2F fue mayor que la disminución en G0F, lo que resultó en un aumento general en el grupo fucosilado (suma de las tres especies principales).

25
30 [0162] Los efectos que tuvo la putrescina en glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados se representan en la Figura 4. Los glicanos de alto contenido de manosa se redujeron con niveles crecientes de putrescina, mientras que se aumentó el nivel de glicanos sialilados.

35 [0163] El hallazgo de que se redujeron los glicanos de alto contenido de manosa, mientras que los niveles de glicanos sialilados, glicanos fucosilados, y glicanos galactosilados se incrementaron, sugiere que la putrescina puede ayudar a promover la maduración de los glicanos.

40 [0164] Este Ejemplo demuestra que el cultivo de células en putrescina se puede usar para producir polipéptidos expresados por las células que tienen niveles particulares de glicanos, tales como glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para producir una preparación de proteína recombinante que tiene un valor diana de uno o más de los glicanos fucosilados, Gglicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados, comprendiendo el método:
- 10 (a) proporcionar una célula genéticamente diseñada para expresar una proteína recombinante;
 (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina y, opcionalmente, que comprende además uno o más de lisina, amonio, DMSO, cobre, glucosa, un factor de crecimiento, una vitamina, un lípido y una peptona, en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y
 (c) recoger una preparación de la proteína recombinante producida por la célula que cumpla con un valor diana, en relación con los glicanos totales, de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados, en donde
- 15 (i) el valor diana de los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados es un nivel al menos un 10% más alto que el nivel, en relación con los glicanos totales, de los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina;
 (ii) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos 10% más bajo que un nivel, en relación con los glicanos totales con alto contenido de manosa en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina;
 (iii) el valor diana de los glicanos fucosilados es de 70% a 100% de glicanos fucosilados;
 (iv) el valor diana de los glicanos galactosilados es del 1% al 95% de glicanos galactosilados;
 20 (v) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1% al 20% de los glicanos con alto contenido de manosa; y/o
 (vi) el valor diana de los glicanos sialilados es de 0,1% a 90% de glicanos sialilados; y, opcionalmente,
- 30 (d) evaluar el nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en la preparación de proteínas recombinantes; y/o,
 (e) formular la preparación en un producto farmacológico.
- 35 **2.** El método de la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es una proteína terapéutica recombinante y/o un anticuerpo terapéutico recombinante.
- 3.** El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el valor diana es:
- 40 (i) un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto terapéutico de referencia;
 (ii) un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia; y/o
 (iii) una especificación de producto farmacéutico predeterminada.
- 45 **4.** El método de la reivindicación 3, en el que la proteína terapéutica de referencia se selecciona del grupo que consiste en: adalimumab, abatacept, abciximab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizigumazum, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, riloncept, rituximab, tositumomab y trastuzumab.
- 50 **5.** El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- (a) proporcionar un valor diana, en relación con el total de glicanos, de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados; y
 (b) formular la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor diana de uno o
 55 más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados; en donde
- 60 (i) el valor diana de los glicanos fucosilados, los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados es un nivel al menos un 10% más alto que el nivel relativo de los glicanos fucosilados, los glicanos galactosilados y/o los glicanos sialilados en una preparación de proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina;
 (ii) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos un 10% más bajo que el nivel, en relación con los glicanos totales, de los glicanos con alto contenido de manosa en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no contenga 0,1 mg/L
 65 10 mg/L de putrescina;
 (iii) el valor diana de los glicanos fucosilados es de 70% a 100% de glicanos fucosilados;

- (iv) el valor diana de los glicanos galactosilados es del 1% al 95% de glicanos galactosilados;
- (v) el valor diana de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1% al 20% de los glicanos con alto contenido de manosa; y/o
- (vi) el valor diana de los glicanos sialilados es de 0,1% a 90% de glicanos sialilados.

5 **6.** El método de la reivindicación 5, que comprende además evaluar un nivel de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos con alto contenido de manosa y glicanos sialilados en la preparación de proteína recombinante.

10 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la etapa de cultivo comprende una primera etapa y una segunda etapa en la que la primera etapa comprende el cultivo de la célula en el medio de cultivo que comprende un primer nivel de putrescina, y comprendiendo la segunda etapa el cultivo de la célula en el medio de cultivo que comprende un segundo nivel de putrescina y, opcionalmente, en donde

- 15 (i) el segundo nivel se incrementa en relación con el primer nivel;
- (ii) el segundo nivel comprende 0,1 mg/L a 10 mg/L de putrescina;
- (iii) la primera etapa comprende el cultivo de la célula en el primer nivel de putrescina durante 1 a 8 días;
- (iv) la segunda etapa comprende el cultivo de la célula en el segundo nivel de putrescina durante 1 a 12 días; y/o
- 20 (v) la segunda etapa comprende la agregación de putrescina al medio de cultivo.

20 **8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula de mieloma murino.

25 **9.** El método de la reivindicación 8, en el que la célula es una célula CHO-K1, una célula CHO-DG44, una célula NS0 o una célula SP2/0-Ag14.

30 **10.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además el registro del nivel evaluado de uno o más de glicanos fucosilados, glicanos galactosilados, glicanos de alto contenido de manosa y glicanos sialilados en un registro de lote para la preparación.

35 **11.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en: adalimumab, abatacept, abciximab, aflibercept, alefacept, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rilonacept, rituximab, tosi- tumomab, and trastuzumab.

40

45

50

55

60

65

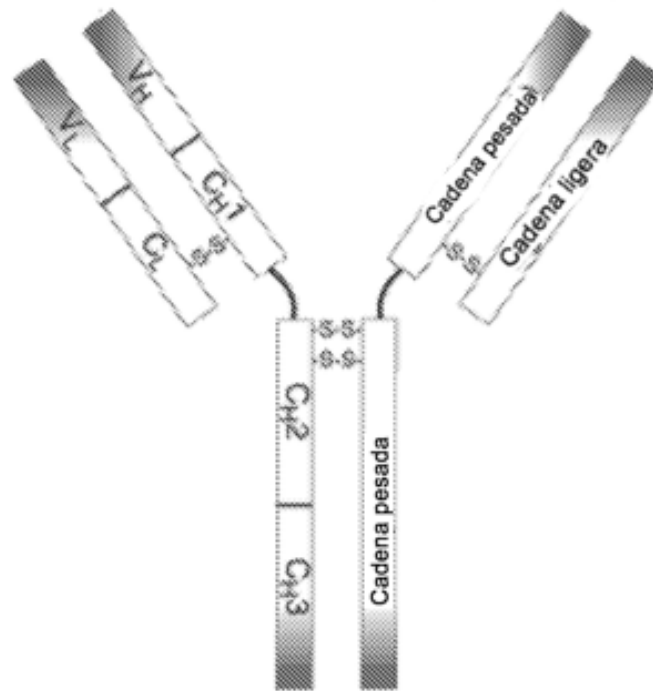


FIG. 1

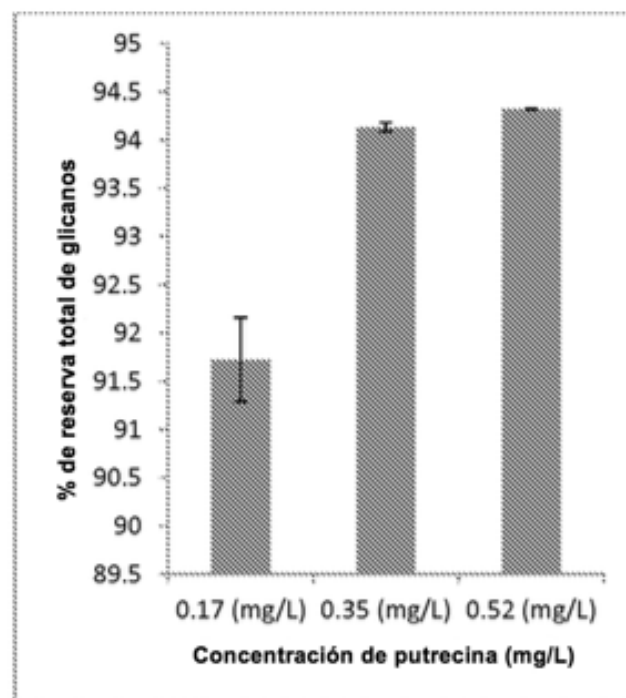


FIG. 2

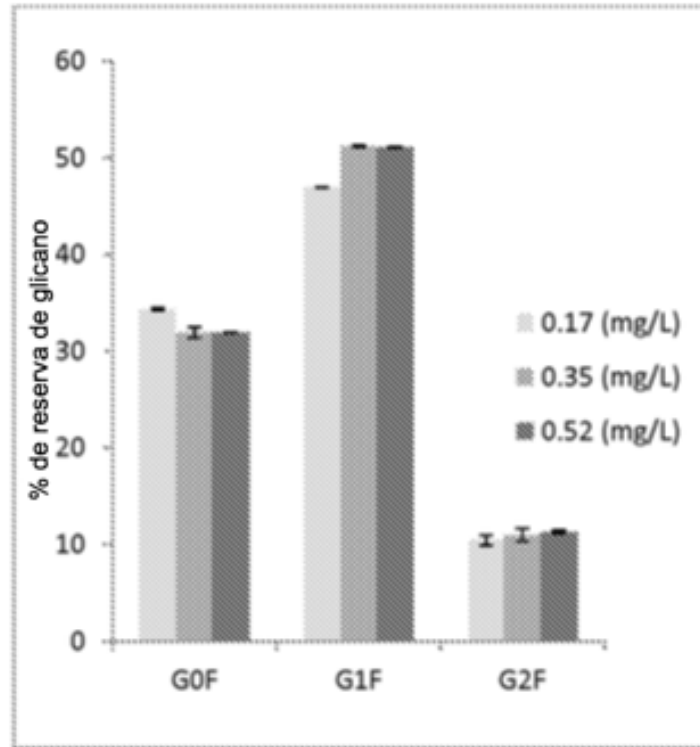


FIG. 3

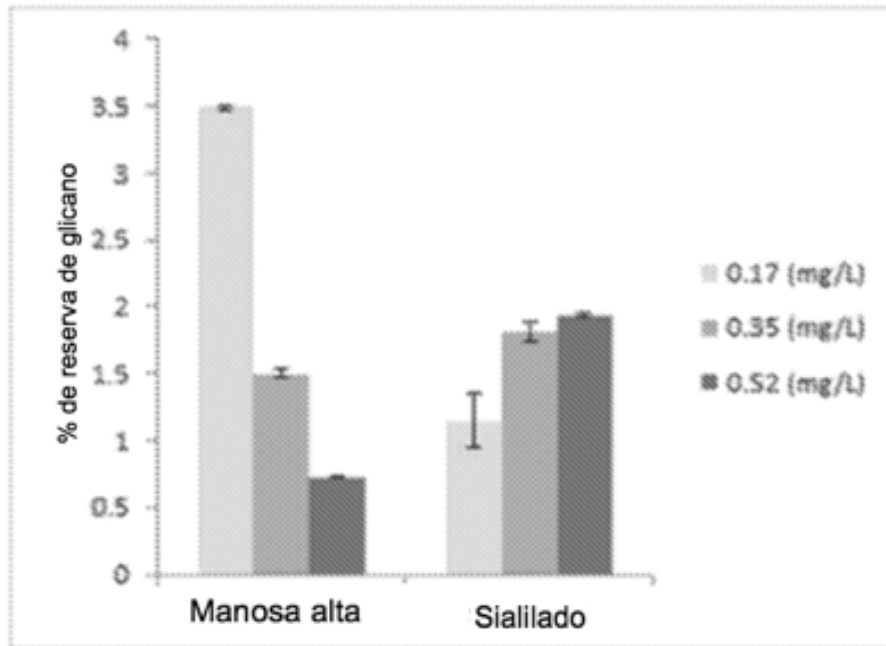


FIG. 4