(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 679**

(51) Int. CI.:

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/US2014/023892**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14150655**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14769180 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2968549**

(54) Título: **Procedimientos de cultivo celular**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201313829292

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PRENTICE, HOLLY;
TIJANI, RASHEED y
BELONGIA, BRETT

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Procedimientos de cultivo celular

Campo de la invención

La invención se refiere en general a procedimientos de cultivo celular. El documento WO2011/061275A1 describe un procedimiento para producir glicoproteínas en un medio que comprende DMSO.

Antecedentes

Los polipéptidos terapéuticos son una clase importante de productos de biotecnología terapéutica y los anticuerpos terapéuticos (incluidos los anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos y sus fragmentos) representan la mayoría de los productos biológicos terapéuticos.

Sumario

La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/ejemplos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen mediante las reivindicaciones.

En particular, la invención proporciona un procedimiento para producir una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante;

(b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende 0,5 % a 5 % de DMSO y, opcionalmente, que comprende además uno o más de glucosamina, lisina, amonio, cobre, putrescina, 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) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula que cumpla un valor objetivo, en relación con los glicanos totales, de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados, en los que

(i) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos un 20 % más alto que el de los glicanos con alto contenido de manosa, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende del 0,5 % al 5 % de DMSO;

(ii) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1 % al 20 % de los glicanos con alto contenido de manosa;

(iii) el valor objetivo de los glicanos fucosilados es de 70 % a 100 % de glicanos fucosilados;

(iv) el valor objetivo de los glicanos sialilados es un nivel al menos un 10 % más alto que el nivel de uno o más de los glicanos sialilados, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende del 0,5 % al 5 % de DMSO; y/o

(v) el valor objetivo de 3,3,1,0,0 glicanos es un nivel al menos un 10 % más alto que un nivel de 3,3,1,0,0 glicanos, en relación con los glicanos totales, en una preparación de proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO; y, opcionalmente,

(d) evaluar el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes; y/o

(e) formular la preparación en un producto farmacológico.

En un aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para producir una preparación de proteína recombinante que tiene un valor objetivo de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, complementado con) DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) cosechar (por ejemplo, purificar o aislar de la célula y/o el medio de cultivo) una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene el valor objetivo de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados. En algunos casos, el medio de cultivo comprende DMSO durante un tiempo y en una cantidad efectiva para modificar (por ejemplo,

aumentar o disminuir) uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados de la proteína recombinante.

El medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % d DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, el valor objetivo es un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en un producto terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor objetivo es un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor objetivo 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 divulgación del producto en una ficha de la FDA, una ficha técnica para el médico, una monografía USP o una monografía EP.

En algunos casos, el producto terapéutico de referencia se selecciona del 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.

El valor objetivo es uno o más de: (a) de al menos aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de glicanos de manosa alta, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, glicanos con alto contenido de manosa; y (b) de al menos aproximadamente del 70 % al 100 % de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 % de glicanos fucosilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el valor objetivo de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y los glicanos fucosilados es más alto que el nivel correspondiente en una preparación producida por el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el valor objetivo 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.

En algunos casos, el procedimiento comprende además evaluar el nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para producir una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar un valor objetivo de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados; (b) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante; (c) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, complementado con) DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; (d) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula; y (e) procesar (por ejemplo, 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 objetivo de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados. En algunos casos, el medio de cultivo comprende DMSO durante un tiempo y en una cantidad efectiva para modificar (por ejemplo, aumentar o disminuir) uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados de la proteína recombinante.

En algunos casos, el procedimiento comprende además evaluar el nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

El medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % d DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, el valor objetivo es un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en un producto terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor objetivo es un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunos casos, el valor objetivo 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 divulgación del producto en una ficha de la FDA, una ficha técnica para el médico, una monografía USP o una monografía EP.

En algunos casos, el producto terapéutico de referencia se selecciona del 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.

El valor objetivo es uno o más de: (a) de al menos aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de glicanos de manosa alta, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, glicanos con alto contenido de manosa; y (b) de al menos aproximadamente del 70 % al 100 % de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 % de glicanos fucosilados. Los glicanos con alto contenido de manosa pueden ser, por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el valor objetivo de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa y los glicanos fucosilados es más alto que el nivel correspondiente en una preparación producida por el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el valor objetivo 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.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para aumentar el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 de glicanos en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula modificada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, complementado con) DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en donde la preparación tiene un nivel incrementado de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos en relación con un nivel en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el medio de cultivo comprende DMSO durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos de la proteína recombinante. En algunos casos, el procedimiento 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 objetivo de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa. glicanos sialilados, y 3,3,1,0,0 glicanos.

El medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % d DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, el procedimiento comprende además medir un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

En algunos casos, el aumento en el nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos 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. En algunas realizaciones, el nivel aumentado es uno o más de: (a) al menos aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de glicanos de manosa alta, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 % o más, glicanos con alto contenido de manosa; (b) al menos aproximadamente del 70 % al 100 % de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 % de glicanos fucosilados; y (c) al menos aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % de glicanos sialilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 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.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para disminuir un nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 de glicanos en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula modificada genéticamente para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel reducido de DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en la que la preparación tiene un nivel disminuido de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos en relación con un nivel en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el medio de cultivo comprende el nivel reducido de DMSO durante un tiempo y en una cantidad efectiva para disminuir un nivel de uno o más de los glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos de la proteína recombinante. En algunos casos, el procedimiento 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 objetivo de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa. glicanos sialilados, y 3,3,1,0,0 glicanos.

El medio comprende de aproximadamente 0,5 a 5 % de DMSO, tal como aproximadamente 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %., 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 % de DMSO.

En algunos casos, el procedimiento comprende además medir un nivel de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

En algunos casos, el nivel disminuido de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, los glicanos

sialilados y los glicanos 3,3,1,0,0 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. En algunos casos, el nivel disminuido es uno o más de: (a) menos de aproximadamente 20 % de glicanos de manosa alta; (b) menos de aproximadamente 90 % de glicanos fucosilados; y (c) menos de aproximadamente 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.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para disminuir un nivel de uno o más glicanos fucosilados en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende (por ejemplo, complementado con) DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en la que la preparación tiene un nivel disminuido de uno o más glicanos fucosilados en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el medio de cultivo comprende DMSO durante un tiempo y en una cantidad eficaz para disminuir el nivel de uno o más glicanos fucosilados de la proteína recombinante. En algunos casos, el procedimiento comprende además procesar, (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, envasar) la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple el valor objetivo de uno o más glicanos fucosilados.

El medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % d DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, el procedimiento comprende además medir un nivel de glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

En algunos casos, el nivel disminuido de los glicanos fucosilados es más bajo que el nivel correspondiente en al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 %, del nivel correspondiente. En algunos casos, el nivel disminuido es inferior a aproximadamente el 100 % de glicanos fucosilados. En algunos casos, el uno o más glicanos fucosilados comprenden glicanos G0F.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para aumentar el nivel de uno o más glicanos fucosilados en una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende un nivel reducido DMSO en condiciones en las que la célula expresa la proteína recombinante; y (c) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula, en la que la preparación tiene un nivel aumentado de uno o más glicanos fucosilados en relación con un nivel correspondiente en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO. En algunos casos, el medio de cultivo comprende un nivel reducido de DMSO durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar el nivel de uno o más glicanos fucosilados de la proteína recombinante. En algunos casos, el procedimiento comprende además procesar, (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, envasar) la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple el valor objetivo de uno o más glicanos fucosilados.

El medio comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO.

En algunos casos, el procedimiento comprende además medir un nivel de glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes. En algunos casos, el procedimiento comprende además registrar el nivel en un medio impreso o legible por ordenador, 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).

En algunos casos, el nivel incrementado de los glicanos fucosilados 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. En algunos casos, el nivel incrementado es de al menos aproximadamente 70 % a 100 % de glicanos fucosilados, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %,

aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 100 % de glicanos fucosilados. En algunos casos, el uno o más glicanos fucosilados comprenden glicanos G0F.

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 un primer medio de cultivo que comprende un primer nivel de DMSO, y la segunda etapa comprende cultivar la célula en un segundo medio de cultivo que comprende un segundo nivel de DMSO. En algunos casos, el primer medio de cultivo comprende un nivel reducido de DMSO en relación con el segundo medio de cultivo y el segundo medio de cultivo comprende un nivel elevado de DMSO en relación con el primer medio de cultivo. En algunos casos, el primer medio de cultivo comprende un nivel elevado de DMSO (por ejemplo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO), y el segundo medio de cultivo comprende un nivel reducido de (por ejemplo, no comprende) DMSO.

En algunos casos, la primera etapa comprende cultivar la célula en el primer medio de cultivo 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 medio de cultivo 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.

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

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

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, belatacept, certolizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, entanercept, gemtuzumab, ibritumomab, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab; panitumumab, ranibizumab, rilonacept, rituximab, tositumomab, and trastuzumab.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, las condiciones en las que las células (por ejemplo, células de mamíferos) 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 ºC, aproximadamente 26 ºC, aproximadamente 27 ºC, aproximadamente 28 ºC, aproximadamente 29 ºC, aproximadamente 30 ºC, aproximadamente 31 ºC, aproximadamente 32 ºC, aproximadamente 33 ºC, aproximadamente 34 ºC, aproximadamente 35 ºC, aproximadamente 36 ºC, aproximadamente 37 ºC, aproximadamente 38 ºC, aproximadamente 39 ºC, o aproximadamente 40 ºC; 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.

En otro aspecto, la divulgación presenta una preparación de una proteína recombinante producida usando un procedimiento descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento para producir una preparación de anticuerpos terapéuticos recombinantes (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 procedimiento: (a) proporcionar un valor objetivo (por ejemplo, una especificación de producto farmacéutico predeterminada 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 de lote maestro de un producto de anticuerpo terapéutico de referencia) de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa (por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9), o combinaciones de los mismos) y glicanos fucosilados; (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 de 0,5 % a 5 % de DMSO (por ejemplo, tal como aproximadamente 0,5 % a

aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o aproximadamente 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 %, o 5 % de DMSO) en condiciones en las que la célula expresa el anticuerpo recombinante; (d) cosechar (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 (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, envasar) la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple el valor objetivo de uno o más de glicanos con alto contenido de manosa y glicanos fucosilados.

Breve divulgación de los dibujos

Las presentes enseñanzas descritas en el presente documento se entenderán más completamente a partir de la siguiente divulgación de varios ejemplos ilustrativos, cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. 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.

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una molécula de anticuerpo IgG.

La Figura 2A es una representación gráfica de los niveles de glicano G0F en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO. La Figura 2B es una representación gráfica de los dos isómeros G1F (indicados como GIFa y G1Fb), o los niveles de glicano G2F en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO.

La Figura 3A es una representación gráfica de los niveles totales de glicanos en manosa en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO. La Figura 3B es una representación gráfica del nivel de glicano alto en manosa 6 (HM6), el nivel de glicano alto en manosa 5 (HM5), o el nivel de glicano alto en manosa 3 y 4 (HM3 y HM4) en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO.

La Figura 4A es una representación gráfica de los niveles de glicanos fucosilados en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO. La Figura 4B es una representación gráfica de los niveles de glicanos fucosilados en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO.

La Figura 5A es una representación gráfica de los niveles totales de glicanos sialilados en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO. La Figura 5B es una representación gráfica de los niveles de glicano sialilado en 3,5,1,1,0 en preparaciones de un anticuerpo modelo de células cultivadas en medio con o sin DMSO.

La Figura 6 representa ilustraciones estructurales de 3,3,1,0,0 y 3,5,1,1,0 glicanos (triángulo = fucosa; círculos gris oscuro = manosa; cuadrados = N-acetil glucosamina; círculo gris claro (entre el cuadrado y el rombo) = galactosa; rombo = ácido siálico). "2AB" es un colorante conjugado con el extremo del glicano que está unido a un polipéptido.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que las preparaciones de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) pueden producirse a partir de células cultivadas en un medio que tiene dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo, un nivel particular de DMSO efectivo para causar tal efecto. Sorprendentemente, el cultivo de las células en un medio que comprende DMSO no afecta al crecimiento celular, la viabilidad celular o el título. La presente divulgación abarca preparaciones de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados), procedimientos para fabricar tales polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) y procedimientos para usar tales polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos).

Definiciones

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 está separado de otros componentes de una célula en la que se produjo (por ejemplo, el retículo endoplásmico o las proteínas citoplásmicas y el ARN). Un polinucleótido aislado es uno que está separado de otros componentes nucleares (por ejemplo, histonas) y/o de secuencias de ácidos nucleicos en sentido ascendente o descendente. Una secuencia de ácido nucleico aislada o una 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 o secuencia de aminoácidos indicada.

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 sintético, que pueden ser de cadena simple o doble, y representan la cadena sentido o antisentido.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" (o "secuencia de aminoácidos" o "proteína") se refiere a una secuencia de oligopéptidos, péptidos, polipéptidos o proteínas, y fragmentos o porciones de los mismos, y a moléculas naturales o sintéticas. "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.

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad (por ejemplo, una dosis) eficaz en el tratamiento de un paciente, que tiene un trastorno o afección descrito 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.

El término "tratamiento" o "que trata", como se usa en el presente documento, se refiere a administrar una terapia en una cantidad, manera y/o modo efectivo 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 técnica. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar según el sujeto y puede adaptarse al sujeto.

Como se usa en el presente documento, 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 una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en el presente 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 sencilla, fragmentos Fab, $F(ab')_2$, Fd, Fv y 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.

Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se refiere a un dímero de dos "polipéptidos Fc", y cada "polipéptido Fc" comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. 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 IgA, 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 se define generalmente que comprende los restos que comienzan en T223 o C226 o P230, hasta su extremo carboxilo, en el que la numeración es según el índice de la UE como en Kabat et al., (1991, NIH Publication 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 IVIG.

Como se usa en el presente documento, un "glicano" es un azúcar. Los glicanos pueden ser monómeros o polímeros de restos de azúcar, pero típicamente contienen al menos tres azúcares, y pueden ser lineales o ramificados. Un glicano puede incluir restos de azúcar natural (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetil neuramínico, 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 homo y heteropolímeros de restos de azúcar. El término "glicano" también abarca un componente de glicano de un glucoconjugado (por ejemplo, de una glicoproteína, glicolípido, proteoglicano, etc.). El término también abarca glicanos libres, incluidos los glicanos que se han escindido o liberado de otro modo a partir de un glicoconjugado.

Como se usa en el presente documento, un "glicano con alto contenido de manosa" se refiere a un glicano que incluye al menos 3 restos 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 restos de azúcar de manosa.

Como se usa en el presente documento, un "glicano sialilado" se refiere a un glicano que incluye al menos 1 ácido siálico. En algunos casos, 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).

Como se usa en el presente documento, la expresión "preparación de glicoproteínas" se refiere a un conjunto de moléculas de glicoproteínas individuales, cada una de las cuales comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos particular (cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un sitio de glicosilación) y al menos un glicano unido covalentemente 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 glicoforma única de una glicoproteína particular, pero más típicamente contiene una pluralidad de glicoformas. Diferentes preparaciones de la misma glicoproteína pueden diferir en la identidad de las glicoformas presentes (por ejemplo, una glicoforma que está presente en una preparación puede estar ausente de otra) y/o en las cantidades relativas de diferentes glicoformas.

El término "glicoforma" se usa en el presente documento para referirse a una forma particular de una glicoproteína. Es decir, cuando una glicoproteína incluye un polipéptido particular que tiene el potencial de estar unido a diferentes glicanos o conjuntos de glicanos, entonces cada versión diferente de la glicoproteína (es decir, cuando el polipéptido está unido a un glicano o conjunto de glicanos en particular) referido como una "glicoforma".

La "glicoproteína de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que (por ejemplo, que tiene aproximadamente 95-100 % de aminoácidos idénticos de) una glicoproteína descrita en el presente documento, por ejemplo, una glicoproteína con 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.

Como se usa en el presente documento, un "sitio de N-glicosilación de una región Fc" se refiere a un resto de aminoácido dentro de una región Fc a la que un glicano está unido a N.

"Valor objetivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel predeterminado de uno o más glicanos particulares, tales como glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados. En algunos casos, un valor objetivo es un valor absoluto. En algunos casos, un valor objetivo es un valor relativo. En algunos casos, un valor objetivo es un nivel de uno o más glicanos particulares, como los glicanos con alto contenido de manosa (por ejemplo, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9 o combinaciones), glicanos fucosilados (por ejemplo, G0F, G1F, G2F, o combinaciones), y/o glicanos sialilados (por ejemplo, monosialilados, desialilados o combinaciones), en un producto de glicoproteína de referencia o descritos en una especificación o registro de lote maestro para un producto farmacéutico.

En algunos casos, un valor objetivo se refiere a un nivel absoluto de (por ejemplo, número de moles de) uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa (por ejemplo, una o más especies de glicanos con alto contenido de manosa), glicanos fucosilados (por ejemplo, uno o más especies de glicanos fucosilados) y/o glicanos sialilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos sialilados) en una preparación de glicoproteína. En algunos casos, un valor objetivo se refiere a un nivel de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa (por ejemplo, una o más especies de glicanos con alto contenido de manosa), glicanos fucosilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos fucosilados) y/o glicanos sialilados (por ejemplo, una o más especies de glicanos sialilados) en una preparación de glicoproteína relativa a los niveles de glicanos totales en la preparación de glicoproteínas. En algunos casos, un valor objetivo se expresa como un "porcentaje", que se refiere al número de moles de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos de Fc) en relación con los moles totales de glicanos (por ejemplo, glicanos de Fc) en una preparación de glicoproteínas. En algunos casos, "porcentaje" se refiere a la cantidad de moles de uno o más glicanos de Fc liberados con PNGasa F en relación con los moles totales de los glicanos de Fc liberados con PNGasa F detectados.

Células

Cualquier célula huésped que pueda usarse para expresar un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) puede usarse en los procedimientos descritos en el presente documento. Las células pueden modificarse genéticamente de modo que contengan 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 materia. Se pueden usar procedimientos conocidos para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de polipéptidos y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

Un vector de expresión puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas pueden luego cultivarse mediante técnicas convencionales, modificadas de acuerdo con la presente divulgación, para producir un polipéptido recombinante. Se pueden usar diversos sistemas de vectores de expresión del huésped (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 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. Tales sistemas de expresión del huésped incluyen, aunque sin limitaciones,, levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces y Pichia*) transformados con vectores de expresión de levadura 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 la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmidos 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 mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K de virus vaccinia).

Para la expresión en células huésped de mamíferos, se pueden utilizar sistemas de expresión basados en virus (véase, por ejemplo, Logan et al., 1984, Proc.. Natl. Acad. Sci. USA 8:355-359). La eficiencia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) expresado. Tales 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 mamífero incluyen, aunque sin limitaciones, 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 forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), células CRL7O3O, HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Ag14 y células de hibridoma. Los ejemplos adicionales no limitantes 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; and Kolkekar et al., 1997, Biochem., 36:10901-10909), CHO-DXB11 (G. Urlaub and L.A. Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 4216-4220. L.H. Graf, y L.A. Chasin 1982, Molec. Cell. Biol., 2: 93-96), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), clon 13 de CHO (GEIMG, Genova, IT), clon B de CHO (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHOKlsv (Edmonds et al., Mol. Biotech. 34:179-190 (2006)), CHO-S (Pichler et al., Biotechnol. Bioeng. 108:386-94 (2011)), células CHO dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216),y las células dp12.CHO (Patente de Estados Unidos n.º5,721,121); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36:59);células de riñón de hámster neonato (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);c élulas 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.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, las células huésped pueden diseñarse para expresar de manera estable un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo). Las células huésped pueden transformarse con 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 procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar un clon recombinante deseado. En algunos casos, una célula está diseñada

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 ADN. sitio de unión 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 codificante del gen se transcriba de manera más eficiente.

Una vez que un polipéptido descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento) se ha producido por expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, columna de intercambio iónico, afinidad y tamaño) cromatografía), centrifugación, solubilidad diferencial, o por 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, salificación 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 procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, WO 02/30954).

De acuerdo con la presente divulgación, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales 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, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Procedimientos de cultivo

En general, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles objetivo de glicanos (por ejemplo, glicanos de alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) pueden producirse cultivando células en medios que contienen DMSO, por ejemplo, un nivel particular y efectivo de DMSO (por ejemplo, durante una o más etapas del cultivo).

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

En algunos casos, las células modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido se cultivan (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye DMSO, por ejemplo, un nivel elevado de DMSO, para aumentar los niveles de glicanos con alto contenido de manosa, glicanos afucosilados, y/o glicanos sialilados en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, el nivel de glicanos ricos en manosa, glicanos afucosilados y/o glicanos sialilados aumenta con respecto al nivel correspondiente en una preparación del polipéptido producido utilizando el mismo medio que no incluye DMSO, por ejemplo, un nivel de DMSO. En algunos casos, el nivel incrementado de glicanos con alto contenido de manosa, glicanos afucosilados y/o glicanos sialilados 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.

En algunos casos, las células modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido se cultivan (por ejemplo, en una o más etapas de cultivo) en un medio que incluye un nivel reducido de DMSO, para aumentar los niveles de glicanos G0F y/o glicanos fucosilados en una preparación del polipéptido expresado por las células. En algunos casos, un nivel de glicanos G0F y/o glicanos fucosilados aumenta con respecto al nivel correspondiente en una preparación del polipéptido producido usando el mismo medio que no incluye un nivel reducido de DMSO. En algunos casos, el nivel aumentado de glicanos G0F y/o glicanos fucosilados es mayor que el (los) nivel(es) 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.

Como se usa en el presente documento, un "nivel elevado de DMSO" significa una concentración más alta de DMSO que la que está presente en un medio estándar, un medio de partida, un medio utilizado en una o más etapas de cultivo, y/o en un medio en el que un polipéptido es producido. En algunos casos, el DMSO 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 DMSO. Un medio puede incluir un nivel elevado de DMSO inicialmente (es decir, al comienzo de un cultivo), y/o el medio puede complementarse con DMSO para lograr un nivel elevado de DMSO en un momento o momentos en particular (por ejemplo, en uno o más etapas) durante el cultivo.

En algunos casos, un nivel elevado de DMSO es un aumento de al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950 %, 1000 % o más aún, en relación con un nivel de DMSO 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.

En algunos casos, un nivel elevado de DMSO es un aumento en el nivel (v/v) de DMSO de al menos 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 %, 5 % o más (v/v) DMSO, en relación con un nivel (v/v) de DMSO 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.

En algunos casos, un nivel elevado de DMSO es 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 %, 5 % o más (v/v) DMSO. En algunos casos, un nivel elevado de DMSO es aproximadamente 0,1 % a 5 % de DMSO, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de DMSO, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % de DMSO,de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %de DMSO o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO.

Como se usa en el presente documento, un "nivel reducido de DMSO" significa una concentración más baja de DMSO que la que está presente en un medio estándar, un medio de partida, un medio utilizado en una o más etapas de cultivo, y/o en un medio en el que un polipéptido es producido. Un medio puede incluir un nivel reducido de DMSO 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 DMSO, y/o un medio puede ser reemplazado por un medio que tenga un nivel reducido de DMSO en un momento o tiempos particulares (por ejemplo, en una o más etapas) durante el cultivo. En algunos casos, un nivel reducido de DMSO es 0 % (v/v) de DMSO o ningún nivel detectable de DMSO en un medio.

En algunos casos, un nivel reducido de DMSO es una disminución de al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en relación con un nivel de DMSO 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.

En algunos casos, un nivel reducido de DMSO es una disminución en el nivel (v/v) de DMSO de al menos 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 %, 5 % o más, (v/v) DMSO, relativo a un nivel (v/v) de DMSO 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.

En algunos casos, un nivel reducido de DMSO es inferior al 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %, 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 % 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 %; o es 0 % (v/v) DMSO,

Las células pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo celular conocidos en la técnica, que se modifican

de acuerdo con la divulgación para incluir DMSO 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 de 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 oligoelementos, 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 (por ejemplo, adenosina, timidina, hipoxantina); antibióticos (por ejemplo, gentamicina); y agentes protectores de células (por ejemplo, un poliol Pluronic (Pluronic F68)).

En algunos casos, además de un nivel elevado o reducido de DMSO, un medio de cultivo celular incluye lisina, cisteína, amonio, manganeso, cobre, cobalto, putrescina, peptona, glucosa, galactosa, galactosamina, glucosamina, glutamina, un lípido (por ejemplo, colesterol) 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 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 de 14 mM a aproximadamente 16 mM de amonio, 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 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 µM a aproximadamente 0,5 mM de cobre; aproximadamente 0,1 mg/l a aproximadamente 30 mg/l de cobalto; aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 5 mg/l de putrescina; aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l glucosa; de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 30 g/l de peptona, por ejemplo, una peptona no derivada de animales tal como soja o semilla de algodón; aproximadamente 1 µM a aproximadamente 1 mM de galactosamina; aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 5 g/l de glucosamina; y/o aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,1 g/l de sulfato de dextrano.

Los medios que se han preparado o están disponibles comercialmente pueden modificarse de acuerdo con la presente divulgación para su utilización en los procedimientos descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de tales medios incluyen medio mínimo esencial (MEM, Sigma, St. Louis, Mo.); medio de Ham F10 (Sigma); medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); RPM 1-1640 medio (Sigma); medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, Utah); Power CHO2 (Lonza Inc., Allendale, NJ); y medios definidos químicamente (CD), que se formulan 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 divulgación.

Las condiciones de cultivo celular (incluyendo pH, O_2, CO_2, velocidad de agitación y temperatura) adecuadas para la producción celular de polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos) son aquellas que se conocen en la técnica, tales como las condiciones para el cultivo celular discontinuo, continuo o semidiscontinuo. Por ejemplo, el pH del medio de cultivo celular generalmente se mantiene entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2.

En algunos casos, las células se cultivan en una o más etapas, y las células se pueden cultivar en un medio que tenga un nivel elevado o reducido de DMSO en una o más etapas. Por ejemplo, un procedimiento de cultivo puede incluir una primera etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel reducido de DMSO) y una segunda etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel elevado de DMSO). En algunos casos, un procedimiento de cultivo puede incluir una primera etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel elevado de DMSO) y una segunda etapa (por ejemplo, usando un medio que tiene un nivel reducido de DMSO). En algunos casos, un procedimiento 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 DMSO o un nivel reducido de DMSO. La duración del cultivo no es limitante. Por ejemplo, un procedimiento 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 procedimiento 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 DMSO (por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días) y una la segunda etapa puede incluir el cultivo de células en un medio que tenga un nivel elevado de DMSO (por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días).

En algunos casos, las células se cultivan en un medio inicial que tiene un nivel reducido de DMSO durante 5 días, y

el medio que tiene un elevado de DMSO se agrega al cultivo de células el día 6.

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 log) donde las células en general se dividen rápidamente. En algunos casos, las células se cultivan en condiciones tales que el crecimiento celular se maximiza. Un experto en la técnica puede determinar el ciclo de crecimiento y las condiciones para maximizar el crecimiento de 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 DMSO o un nivel elevado de DMSO para todo o parte de una etapa de crecimiento.

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, el crecimiento celular logarítmico ha terminado y la producción de polipéptidos aumenta. 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 DMSO o un nivel elevado de DMSO para la totalidad o parte de una etapa de producción.

En general, los procedimientos de cultivo celular se clasifican como cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo semidiscontinuo. Cualquiera de estos procedimientos de cultivo puede usarse para cultivar células que producen polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados).

Cultivo discontinuo

En el cultivo discontinuo, se agrega una pequeña cantidad de solución de cultivo de semilla a un medio y las células se cultivan sin ninguna adición de un nuevo medio o descarga de solución de cultivo durante el cultivo. Para la producción de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) utilizando un cultivo discontinuo, el medio comprende un nivel elevado o un nivel reducido de DMSO en una etapa inicial del cultivo celular.

En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) se producen por cultivo discontinuo de células que expresan el polipéptido en un medio que tiene un nivel elevado de DMSO. El medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % d DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) se producen por cultivo discontinuo de células que expresan el polipéptido en un medio que tiene un nivel reducido de DMSO. Las células se cultivan en un medio que tiene de aproximadamente de 0,5 a 5% de DMSO, tal como aproximadamente 5%, 4,9%, 4,8%, 4,7%, 4,6%, 4,5%, 4,4%, 4,3%, 4,2%, 4,1%, 4%, 3,9%, 3,8%, 3,7%, 3,6%, 3,5%, 3,4%, 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3%, 2,9%, 2,8%, 2,7%, 2,6%, 2,5%, 2,4%, 2,3%, 2,2%, 2,1%, 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5% (v/v) de DMSO.

Cultivo continuo

El cultivo continuo es un procedimiento de cultivo en el que se agrega y descarga un medio continuamente durante el cultivo. Este procedimiento 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 con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) utilizando un cultivo continuo, el nivel de DMSO en el medio se puede ajustar en uno o más etapas de cultivo para dar como resultado un nivel elevado o un nivel reducido de DMSO. En ciertos procedimientos, el medio de cultivo usado en una primera etapa de cultivo no incluye un nivel elevado o un nivel reducido de DMSO, 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 añadido durante el cultivo es elevado o reducido en el nivel de DMSO.

En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) se producen por cultivo continuo de células que expresan el polipéptido en un medio que tiene un nivel elevado de DMSO (por ejemplo, durante una o más etapas de cultivo continuo). Las células se cultivan durante una o más etapas de cultivo continuo en el medo que tiene de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO, tal como aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % de DMSO. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 % o 5 % de DMSO.

En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene un nivel reducido de DMSO. En algunos casos, las células se cultivan, durante una o más etapas de cultivo continuo, en un medio que tiene aproximadamente de 0,5 a 5 % de DMSO, tal como aproximadamente 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %, 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 % (v/v) de DMSO.

Cultivo semidiscontinuo

El cultivo semidiscontinuo es un procedimiento entre el cultivo discontinuo y el cultivo continuo. En un cultivo semidiscontinua, 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 (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) usando cultivo semidiscontinuo, el medio añadido durante una o más etapas del cultivo puede tener un nivel elevado o un nivel reducido de DMSO.

En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) se producen agregando medio (en una o más etapas) a un cultivo semidiscontinuo de células que expresan el polipéptido suficiente para lograr (en una o más etapas) un nivel elevado de DMSO. En algunas realizaciones, aproximadamente el 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 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 %, 4 %, 4,1 %, 4,2 %, 4,3 %, 4,4 %, 4,5 %, 4,6 %, 4,7 %, 4,8 %, 4,9 %, 5 % (v/v) de DMSO en el medio de cultivo se logra (por ejemplo, agregando o complementando con DMSO, por ejemplo, en una o más etapas). En algunas realizaciones, se logra un nivel de DMSO de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % de DMSO tal como aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, aproximadamente de 0,5 % a aproximadamente 1,5 % de DMSO, aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 1,4 % de DMSO, aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 1,3 % de DMSO, aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 1,2 % de DMSO, aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 1,1 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de DMSO, aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 % de DMSO, aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 % de DMSO, aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % de DMSO, aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % de DMSO, o aproximadamente 3 % a aproximadamente DMSO al 5 %.

En algunos casos, los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tienen niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) se producen añadiendo medio (en una o más etapas) a un cultivo semidiscontinuo de células que expresan el polipéptido suficiente para lograr (en una o más etapas) un nivel reducido de DMSO. En algunas realizaciones, se logra de aproximadamente 0,5 a 5 % de DMSO, tal como aproximadamente 5 %, 4,9 %, 4,8 %, 4,7 %, 4,6 %, 4,5 %, 4,4 %, 4,3 %, 4,2 %, 4,1 %, 4 %, 3,9 %, 3,8 %, 3,7 %, 3,6 %, 3,5 %, 3,4 %, 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 2 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0.5 % (v/v) de DMSO en el medio de cultivo (en una o más etapas).

Según la presente divulgación, el cultivo celular puede llevarse a cabo en condiciones para la producción a gran o pequeña escala de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos), usando vasos de cultivo y/o aparatos de cultivo que se

emplean convencionalmente para cultivos de células de animales o de mamífero. Por ejemplo, se pueden usar placas de cultivo de tejidos, matraces T, matraces de agitación y matraces giratorios 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. ser utilizado (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.541.164 y 7.332.303).

En los procedimientos particulares, los niveles de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glucanos fucosilados y/o 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 DMSO en el cultivo) o posiblemente la terminación del cultivo para, por ejemplo, lograr un nivel objetivo de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que tengan niveles específicos de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados).

Polipéptidos

En el presente documento se describen preparaciones terapéuticas de polipéptidos (por ejemplo, glicoproteínas) y procedimientos para preparar y usar tales 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.

Una glicoproteína descrita en el presente documento puede incluir un dominio de unión a diana que se une a una diana de interés (por ejemplo, se une a un antígeno). Por ejemplo, una glicoproteína, tal como un anticuerpo, puede unirse a un polipéptido transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando (por ejemplo, un factor de crecimiento). Las dianas moleculares de ejemplo (por ejemplo, antígenos) para glicoproteínas descritas en el presente 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 HER4 (ErbB4); receptores de macrófagos tales como CRIg; factores de necrosis tumoral tales como TNFα o TRAIL/Apo-2; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina αvβ3, incluidas las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD 18 o anti-CD11b); factores de crecimiento y receptores tales como EGF, FGFR (por ejemplo, FGFR3) y VEGF; IgE; citoquinas 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); linfotoxinas, tales como la linfotoxina alfa (LTa). Otras dianas moleculares incluyen Tweak, B7RP-1, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), esclerostina, c-kit, Tie-2, c-fms y anti-Ml.

Polipéptidos de referencia

En algunos casos, en el presente documento se describen polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, Glicoproteínas) que tienen niveles dirigidos de glicanos (por ejemplo, Glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados), donde los niveles diana son los niveles de glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido en manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados en un producto polipeptídico de referencia (por ejemplo, producto de glicoproteína). Los productos de glicoproteínas de referencia no limitantes y de ejemplo pueden incluir abatacept (Orencia®, Bristol-Myers Squibb), abciximab (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-Laille)), 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 Pharmaceutic als), infliximab (Remicade®, Centocor), ipilimumab (Yervoy ™, Bristol-Myers Squibb), muromonab (Orthoclone OKT3®, Janssen-Cilag), natalizraab (Tysabri®, Biogen Idec, Elan), ofatumumab (Arzeris®, Glaxas)), omalizumab (Xolair®, Novartis), palivizumab (Synagis®, MedImmune), panitumumab (Vectibix®, Amgen), ranibizumab (Lucentis®, Genentech), rilonacept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals), rituximab, tocilizumab (Actemra®, Genentech; RoActemra, Hoffman-La Roche) tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline) y trastuzumab (Herceptin®, Roche).

En algunos casos, el nivel de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o 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 (por ejemplo, glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados y/o glicanos sialilados) en un producto polipeptídico de referencia es un rango de uno o más glicanos en dos o más preparaciones del 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 intervalo (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.

Glicosilación ligada a N

Las cadenas de oligosacáridos ligadas a N se agregan a una proteína en el lumen del retículo endoplásmico (véase Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc. (Alberts et al., 1994)). Específicamente, se agrega un oligosacárido inicial (típicamente 14-azúcar) al grupo amino en la cadena lateral de un resto de asparagina contenido dentro de la secuencia de consenso objetivo 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 restos de glucosa, 9 de manosa y 2 de 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 N-acetilglucosamina y tres restos de manosa.

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

Después del procesamiento inicial en el retículo endoplásmico, la glicoproteína se transporta al Golgi, donde puede tener lugar un procesamiento adicional. 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".

Adicional o alternativamente, se pueden añadir una o más unidades de monosacáridos de N-acetilglucosamina a las subunidades de manosa central para formar un "glicano complejo". La galactosa se puede añadir 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 resto de N-acetilglucosamina. Además, se puede añadir un resto de fucosa a un resto de N-acetilglucosamina del oligosacárido central. Cada una de estas adiciones está catalizada por glucosil transferasas específicas, conocidas en la técnica.

Los ácidos siálicos son una familia de monosacáridos de 9 carbonos con estructuras anulares heterocíclicas. Llevan una carga negativa a través de un grupo ácido carboxílico unido al anillo, así como otras decoraciones químicas, incluidos los grupos N-acetilo y N-glicolilo. Los dos tipos principales de restos 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 se producen usualmente como estructuras terminales unidas a restos de galactosa (Gal) en los extremos no reductores de los glicanos unidos por N y O. Las configuraciones del enlace glicosídico para estos grupos sialilo pueden ser α2,3 o α2,6.

Los "glicanos híbridos" comprenden las características de los glicanos tanto complejos como de manosa alta. Por ejemplo, una rama de un glicano híbrido puede comprender principalmente o exclusivamente restos de manosa, mientras que otra rama puede comprender azúcares N-acetilglucosamina, ácido siálico y/o galactosa.

Glicosilación ligada a N en anticuerpos

Los anticuerpos están glicosilados en sitios de glicosilación unidos a N conservados en las regiones Fc de las 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 unidos a N dentro de los dominios CH2 y CH3, los anticuerpos IgE tienen sitios de glicosilación unidos a N dentro del dominio CH3 y los anticuerpos IgM tienen sitios de glicosilación unidos a N dentro de los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4 (véase Arnold et al., J. Biol. Chem. 29080-29087 (2005); Mattu y otros, J. Biol. Chem. 273:2260-2272 (1998); Nettleton et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 107:328-329 (1995)).

Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos unidos a N en las regiones constantes. Por ejemplo, la IgG tiene un solo carbohidrato biantenario ligado a N 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); and Wright et al., Trends Biotech 15:26-32 (1997)). Para la IgG humana, el oligosacárido central normalmente consiste en $GlcNAc_2Man_3GlcNAc$, con diferentes números de restos externos. La variación entre las IgG individuales puede producirse 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

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 pesadas constantes (CH) y ligeras constantes (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).

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales (por ejemplo, IVIG), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena única (scFv), Fvs ligados a disulfuro (sdFv) y anticuerpos anti-idiotípicos (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.

El término "fragmento Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de una región Fc que retiene una función y/o actividad de Fc descrita en el presente documento, tal como la unión a un receptor de 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. La expresión "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 incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un F (ab ')$_2$ fragmento, 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.

Las glicoproteínas de referencia descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos de referencia) o fragmentos de las mismas pueden producirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica para sintetizar 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 procedimientos descritos en, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202y anticuerpos humanizados por procedimientos descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.180.370.

Los anticuerpos de referencia adicionales descritos 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); and Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

Conjugados de glicoproteínas

La divulgación incluye glicoproteínas (o regiones Fc o fragmentos Fc que contienen uno o más sitios de N-glicosilación de los mismos) que están conjugados o fusionados con uno o más restos heterólogos. Los restos heterólogos incluyen, aunque sin limitaciones,, 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, Hallewell et al. (1989), J. Biol. Chem. 264, 5260-5268; Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8, 725-731; Robinson & Sauer (1996)).

Entre los ejemplos de productos de conjugación de glicoproteínas no limitantes se incluyen abatacept (Orencia®, Bristol-Myers Squibb), aflibercept (Eylea®, Regeneron Pharmaceuticals), alefacept (Amevive®, Astellas Pharma), belatacept (Nulojix®, Bristol-Myers Squibb), denileukin diftitox (Ontak®, Eisai), etanercept (Enbrel®, Amgen-Pfizer) y rilonacept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals).

En algunos casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilaciones de la misma) conjugado a 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.

En algunos casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilación del mismo) conjugados con una o más secuencias marcadoras, como un péptido para facilitar la purificación. Una secuencia de aminoácidos marcador particular es un péptido hexa-histidina, como la etiqueta provista en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311). Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, entre otros, la marca de hemaglutinina “HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) y la marca "Flag".

En otros casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilación de la misma) conjugado 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, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se puede lograr mediante el acoplamiento de una glicoproteína a sustancias detectables que incluyen, aunque sin limitaciones,, diversas enzimas, tales como, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitaciones, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato 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, tales como pero no limitado a yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^{3}H), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), galio (^{68}Georgia, ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm ^{177}Lu, ^{153}Gd, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{169}Yb ^{175}Yb ^{166}Ho, ^{90}Y ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn ^{85}Sr, ^{32}P, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se ^{113}Sn, y ^{117}Sn 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.

Las técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas (véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)).

Evaluación de glicano

En algunos casos, los glicanos de las glicoproteínas se analizan mediante cualquier procedimiento 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, espectrometría de masas (MS) enzimática, cromatográfica, cromatografía seguida de MS, procedimientos electroforéticos, procedimientos electroforéticos seguidos de MS, resonancia magnética nuclear (RMN), y combinaciones de los mismos. Los procedimientos enzimáticos de ejemplo incluyen poner en contacto 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 PNGasa F. Los procedimientos cromatográficos ejemplares incluyen, aunque sin limitaciones,, cromatografía de intercambio aniónico fuerte que utiliza detección amperométrica pulsada (SAX-PAD), cromatografía líquida (LC), líquido de alto rendimiento cromatografía (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) de ejemplo 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 por transformada de Fourier (FTMS), movilidad de iones separación con espectrometría de masas (IMS-MS), disociación de transferencia de electrones (ETD-MS) y combinaciones de los mismos. Los procedimientos electroforéticos ejemplares incluyen, aunque sin limitaciones,, 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 Western utilizando anticuerpos que reconocen estructuras específicas de glicanos, y combinaciones de los mismos. La resonancia magnética nuclear (RMN) de ejemplo incluye, pero no se limita a, RMN unidimensional (1D-RMN), RMN bidimensional (2D-RMN), espectroscopía de correlación de ángulo magnético RMN (COSY-RMN), correlación total espectroscopía RMN (TOCSY-RMN), RMN heterogénea de coherencia cuántica mononuclear (HSQC-RMN), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC-RMN), espectroscopia de efecto de sobrehalador nuclear rotacional (NOESY-RMN)), y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, las técnicas descritas en el presente documento pueden combinarse con una o más tecnologías para la detección, análisis y/o aislamiento de glicanos o glicoproteínas. Por ejemplo, en ciertos casos, los glicanos se analizan de acuerdo con la presente divulgación utilizando uno o más procedimientos disponibles (para dar solo algunos ejemplos, véase Anumula, Anal. Biochem., 350(1):1, 2006; Klein et al., Anal. Biochem., 179:162, 1989; and/or Townsend, R.R. Carbohydrate Analysis" High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis., Ed. Z. E1 Rassi, pp 181-209, 1995; WO2008/128216; WO2008/128220; WO2008/128218; WO2008/130926; WO2008/128225; WO2008/130924; WO2008/128221; WO2008/128228; WO2008/128227; WO2008/128230; WO2008/128219; WO2008/128222; WO2010/071817; WO2010/071824; WO2010/085251; WO2011/069056; and WO2011/127322,). Por ejemplo, en algunos casos, los glicanos se caracterizan utilizando uno o más de los procedimientos cromatográficos, los procedimientos electroforéticos, los procedimientos de resonancia magnética nuclear y combinaciones de los mismos. En algunos casos, los glicanos se analizan marcando con un colorante fluorescente y midiendo los niveles de fluorescencia.

En algunos casos, los procedimientos 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, pueden realizarse mediante uno o más de los procedimientos enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1: Procedimientos de ejemplo de evaluación de parámetros:

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

La literatura citada puede pertenecer a uno o más de los procedimientos para determinar un parámetro descrito en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas y administración

Una glicoproteína descrita en el presente documento puede incorporarse (por ejemplo, formularse) 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 pueden formularse mediante procedimientos 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, tales como agua estéril y solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, agente de suspensión, tensioactivo, estabilizante, excipiente aromatizante, 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.

Una composición estéril para inyección se puede formular de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales que utilizan 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 80™, HCO-50 y similares.

Los ejemplos no limitantes de líquido aceitoso incluyen aceite de sésamo y aceite de soja, y puede combinarse con benzoato de bencilo o alcohol bencílico 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 bencílico o fenol y un antioxidante. Una inyección formulada se puede envasar en una ampolla adecuada.

En algunos casos, un nivel de uno o más glicanos descritos en el presente documento puede compararse con un nivel predeterminado (por ejemplo, un nivel correspondiente en un estándar de referencia), por ejemplo, para tomar una decisión con respecto a la composición de la preparación del polipéptido, por ejemplo, una decisión para clasificar, seleccionar, aceptar o descartar, liberar o retener, procesar en un producto farmacéutico, enviar, mudarse a una ubicación diferente, formular, etiquetar, empaquetar, liberar para el comercio u vender u ofrecer a la venta el polipéptido, por ejemplo, un recombinante anticuerpo. 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 limitantes, de estándares de referencia incluyen un nivel de control (por ejemplo, un polipéptido producido por un procedimiento 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.

En algunos casos, los procedimientos (es decir, los procedimientos de evaluación, identificación y producción) incluyen tomar acción (por ejemplo, acción física) en respuesta a los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, una preparación de polipéptidos se clasifica, selecciona, acepta o desecha, libera o retiene, se transforma 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 u objetivo. En algunos casos, el procesamiento puede incluir la formulación (por ejemplo, la combinación con excipientes farmacéuticos), el empaque (por ejemplo, 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 el presente documento. El procesamiento puede incluir dirigir y/o contratar a otra parte para que procese como se describe en el presente documento.

En algunos casos, se evalúa la actividad biológica de una preparación de polipéptidos (por ejemplo, una preparación de anticuerpos). La actividad biológica de la preparación se puede analizar mediante cualquier procedimiento 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 (por ejemplo, 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 (por ejemplo, biodisponibilidad, farmacocinética, farmacodinámica). Para los procedimientos de análisis de la biodisponibilidad, la farmacocinética y la farmacodinamia de las terapias con glicoproteínas, 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; and Srinivas et al., Pharm. Res. 14(7):911-6, 1997.

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

La vía 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.

Se puede seleccionar un medio de administración adecuado en función de la edad y el estado del paciente. Una dosis única de la composición farmacéutica que contiene una glicoproteína modificada se puede seleccionar de un rango de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal. Por otro lado, se puede seleccionar una dosis en el intervalo de 0,001 a 100000 mg/peso corporal, pero la presente divulgación no se limita a tales intervalos. La dosis y el procedimiento de administración varían de acuerdo con el peso, la edad, el estado y similares del paciente, y los expertos en la técnica pueden seleccionarlos adecuadamente según sea necesario.

Los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente divulgación se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados.

La divulgación se ilustra con más detalle en el siguiente ejemplo. El ejemplo se proporciona únicamente con fines ilustrativos. No debe interpretarse como que limita el alcance o el contenido de la divulgación de ninguna manera.

EJEMPLO

Efecto del DMSO en la glicosilación

Procedimientos

Se analizó el efecto de DMSO en las glicoformas de anticuerpos de un anticuerpo modelo producido por células CHO. Se cultivaron células CHO inicialmente en medios básicos (Power CHO2, número de catálogo BE15-771, Lonza Inc., Allendale, NJ) que contenían hidrolizado de soja, Lonza Power Feed A y suplementos adicionales. El día 3, las células se alimentaron con Lonza Power Feed A e hidrolizado de soja. El día 6, las células se alimentaron con medio Lonza Power Feed A y suplementos adicionales con DMSO al 2,5 % (concentración final) o sin DMSO. Las células se alimentaron con 2 g/l de glucosa cuando la concentración de glucosa descendió por debajo de 2 g/l. Las células se recolectaron los días 10, 12 o 14, y los anticuerpos producidos se evaluaron para determinar el título y la composición del glicano.

La cuantificación relativa de cada glicoforma se realizó en glicanos liberados enzimáticamente del anticuerpo utilizando PNGasa F y marcados con el fluoróforo 2-aminobenzamida. Las cantidades relativas se basaron en la intensidad de fluorescencia de las especies relevantes en relación con la intensidad de fluorescencia total en el cromatograma. Todas las glicoformas que se eluyen en el mismo tiempo de retención se consideraron juntas.

Resultados

La presencia o ausencia de DMSO en el medio de cultivo tuvo un impacto mínimo en el título o VCD máximo. Las células cultivadas en presencia de DMSO tenían un VCD máximo promedio de 8,0 x 10^6 células/ml y un título de 1,02 g/l, mientras que las células cultivadas en ausencia de DMSO tuvieron un VCD máximo promedio de 8,1 x 10^6 células/ml y un título de 0,92 g/l.

Como se muestra en la Figura 2A, el nivel de G0F se redujo en los anticuerpos cultivados en presencia de DMSO (aproximadamente una disminución del 7 % el día 14). Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 2B, los niveles de GIF y G2F se vieron solo ligeramente afectados por la presencia de DMSO (en aproximadamente un 1 % o menos). Esto indica que la presencia de DMSO no modificó la distribución de G0F/G1F/G2F al alterar los niveles de galactosilación. Más bien, este hallazgo sugiere que G0F se desvió a otras especies. Se observó un aumento concomitante en 3,3,1,0,0 glicanos (estructura mostrada en la Figura 6; datos no mostrados). Como el 3,3,1,0,0 se convierte en G0F por GnTII, sin querer limitarse por ninguna teoría, el DMSO puede actuar, al menos en parte, alterando la conversión de 3,3,1,0,0 a G0F por GnTII. Además, como se muestra en la Figura 2A, la presencia de DMSO tuvo un efecto temporal en los niveles de G0F, que disminuyó en los días 10, 12 y 14.

El impacto del DMSO en los glicanos con alto contenido de manosa se muestra en las Figuras 3A y 3B. Como se muestra en la Figura 3A, el DMSO aumentó el nivel total de glicanos con alto contenido de manosa en comparación con ningún DMSO. Además, el DMSO condujo a un aumento de los niveles de glicanos de alto contenido de manosa 6, alto contenido de manosa 3 y alto contenido de manosa 5 (véase la Figura 3B).

El DMSO también afectó el nivel de glicanos fucosilados, lo que resultó en una disminución del nivel de glicanos fucosilados (Figura 4A), con un aumento de los glicanos afucosilados (Figura 4B). Además, el DMSO dio como resultado un aumento de los glicanos sialilados (Figura 5A), con un aumento específico en el nivel de glicano sialilado 3,5,1,1,0 (Figura 5B; la estructura se muestra en la Figura 6).

Este ejemplo demuestra que el cultivo de células en DMSO se puede usar para producir polipéptidos, expresados por las células, que tienen niveles particulares de glicanos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una preparación de proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar una célula genéticamente modificada para expresar una proteína recombinante;

(b) cultivar la célula en un medio de cultivo que comprende 0,5 % a 5 % de DMSO y, opcionalmente, que comprende además uno o más de glucosamina, lisina, amonio, cobre, putrescina, 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) cosechar una preparación de la proteína recombinante producida por la célula que cumpla un valor objetivo, en relación con los glicanos totales, de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados, en los que

(i) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos un 20 % más alto que el de los glicanos con alto contenido de manosa, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende del 0,5 % al 5 % de DMSO;

(ii) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1 % al 20 % de los glicanos con alto contenido de manosa;

(iii) el valor objetivo de los glicanos fucosilados es de 70 % a 100 % de glicanos fucosilados;

(iv) el valor objetivo de los glicanos sialilados es un nivel al menos un 10 % más alto que el nivel de uno o más de los glicanos sialilados, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende del 0,5 % al 5 % de DMSO; y/o

(v) el valor objetivo de 3,3,1,0,0 glicanos es un nivel al menos un 10 % más alto que un nivel de 3,3,1,0,0 glicanos, en relación con los glicanos totales, en una preparación de proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende DMSO; y, opcionalmente,

(d) evaluar el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados en la preparación de proteínas recombinantes; y/o

(e) formular la preparación en un producto farmacológico.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es una proteína terapéutica recombinante y/o un anticuerpo terapéutico recombinante.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el valor objetivo es:

i) un nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados en un producto terapéutico de referencia;

ii) un nivel de uno o más de glicanos de alto contenido en manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia; y/o

iii) una especificación de producto farmacéutico predeterminada.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el producto terapéutico de referencia 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, tositumomab y trastuzumab.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende:

(a) proporcionar un valor objetivo, en relación con los glicanos totales, de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, los glicanos sialilados, los glicanos 3,3,1,0,0 y los glicanos fucosilados; y

(b) formular la preparación en un producto farmacológico si la preparación cumple con el valor objetivo de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados, en donde

(i) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es un nivel al menos un 20 % más alto que el de los glicanos con alto contenido de manosa, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende del 0,5 % al 5 % de DMSO;

(ii) el valor objetivo de los glicanos con alto contenido de manosa es del 0,1 % al 20 % de los glicanos con alto contenido de manosa;

(iii) el valor objetivo de los glicanos fucosilados es un nivel al menos un 10 % más bajo que un nivel de glicanos fucosilados, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende de 0,5 % a 5 % de DMSO; y/o

(iv) el valor objetivo de los glicanos fucosilados es del 70 % al 100 % de glicanos fucosilados;

(v) el valor objetivo de los glicanos sialilados es un nivel al menos 10 % más alto que el nivel de uno o más de los glicanos sialilados, en relación con los glicanos totales, en una preparación de la proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en un medio que no comprende de 0,5 % a 5 % de DMSO; y/o

(vi) el valor objetivo de 3,3,1,0,0 glicanos es un nivel al menos 10 % más alto que un nivel de 3,3,1,0,0 glicanos, en relación con los glicanos totales, en una preparación de Proteína recombinante producida mediante el cultivo de la célula en el medio que no comprende de 0,5 % a 5 % de DMSO.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además evaluar el nivel de uno o más de glicanos de alto contenido de manosa, glicanos sialilados, 3,3,1,0,0 glicanos y glicanos fucosilados en la preparación de proteína recombinante.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el uno o más glicanos fucosilados comprenden glicanos G0F.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la etapa de cultivo comprende una primera etapa y una segunda etapa, en donde la primera etapa comprende cultivar la célula en el medio de cultivo que comprende un primer nivel de DMSO, y la segunda etapa comprende cultivar la célula en el medio de cultivo que comprende un segundo nivel de DMSO; y opcionalmente en el que

(i) el segundo nivel se incrementa en relación con el primer nivel;

(ii) el primer nivel de DMSO no es DMSO y el segundo nivel de DMSO es de 1 % a 5 % de DMSO;

(iii) la primera etapa comprende cultivar la célula en el primer nivel de DMSO durante 1 a 8 días;

(iv) la segunda etapa comprende cultivar la célula en el segundo nivel de DMSO durante 1 a 12 días; y/o

(v) la segunda etapa comprende la adición de DMSO al medio de cultivo.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula de mieloma murino; opcionalmente, en el que la célula es una célula CHO-K1, una célula CHO-DG44, una célula NS0 o una célula SP2/0-Ag14.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el medio de cultivo comprende 0,5 % a 1,5 % de DMSO.

11. El procedimiento 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, tositumomab y trastuzumab.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además registrar el nivel evaluado de uno o más de los glicanos con alto contenido de manosa, glicanos fucosilados, glicanos sialilados y 3,3,1,0,0 glicanos en un registro de lote para la preparación.

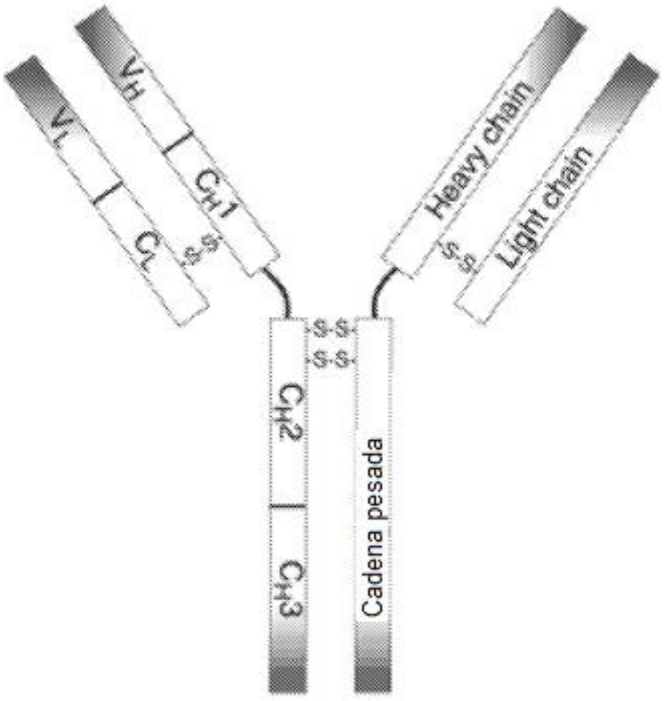


FIG. 1

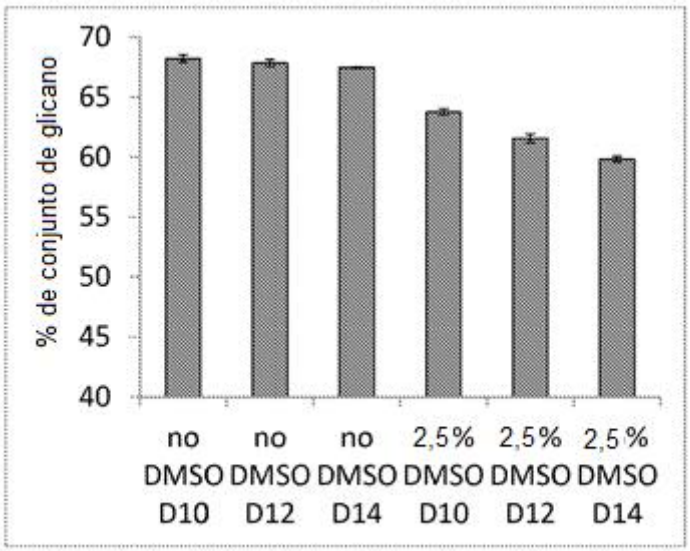

% de conjunto de glicano
70
65
60
55
50
45
40
no DMSO D10
no DMSO D12
no DMSO D14
2,5% DMSO D10
2,5% DMSO D12
2,5% DMSO D14

FIG. 2A

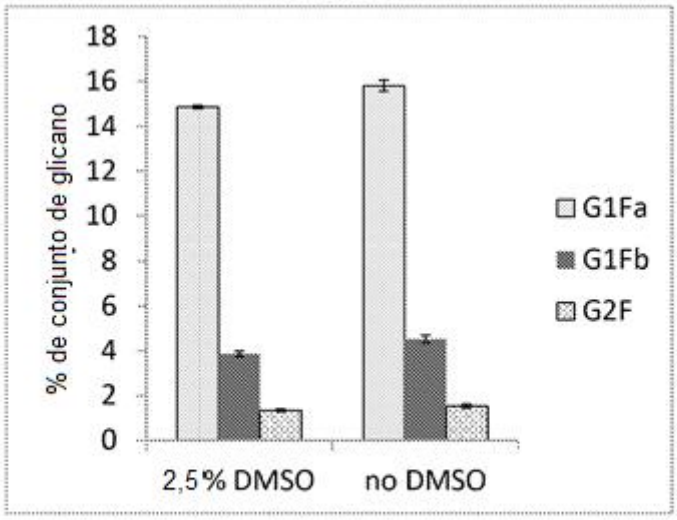

% de conjunto de glicano
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2,5% DMSO
no DMSO
G1Fa
G1Fb
G2F

FIG. 2B

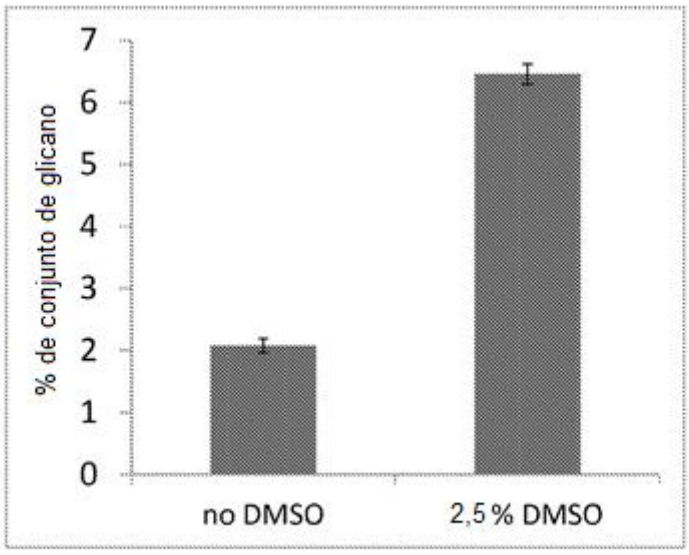

% de conjunto de glicano
7
6
5
4
3
2
1
0
no DMSO
2,5 % DMSO

FIG. 3A

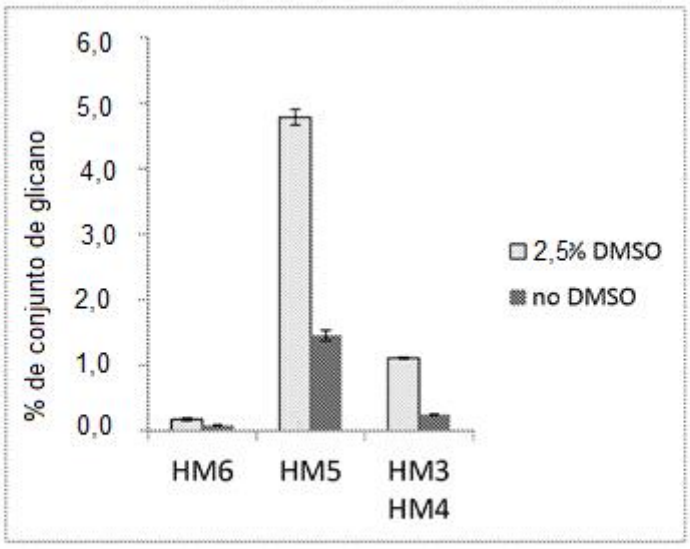

% de conjunto de glicano
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
HM6
HM5
HM3
HM4
2,5% DMSO
no DMSO

FIG. 3B

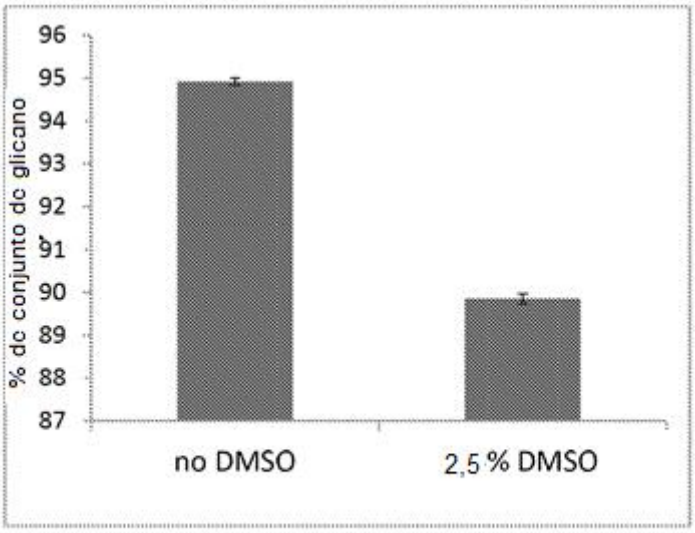

96
95
94
93
92
91
90
89
88
87
% de conjunto de glicano
no DMSO
2,5 % DMSO

FIG. 4A

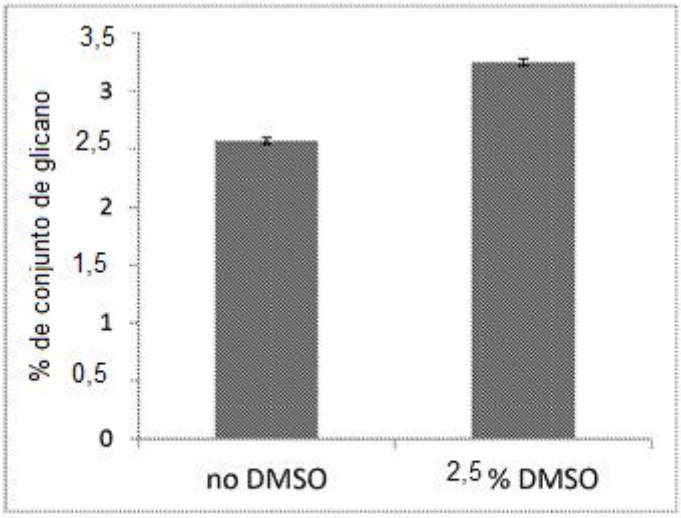

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
% de conjunto de glicano
no DMSO
2,5 % DMSO

FIG. 4B

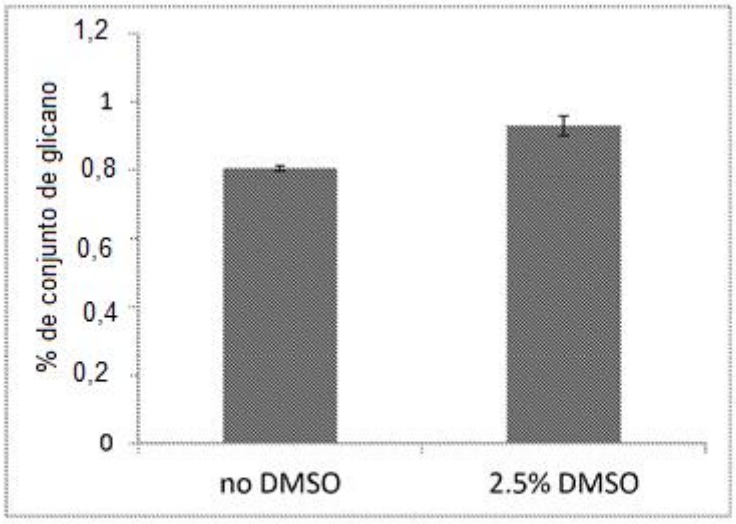

1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
% de conjunto de glicano
no DMSO
2.5% DMSO

FIG. 5A

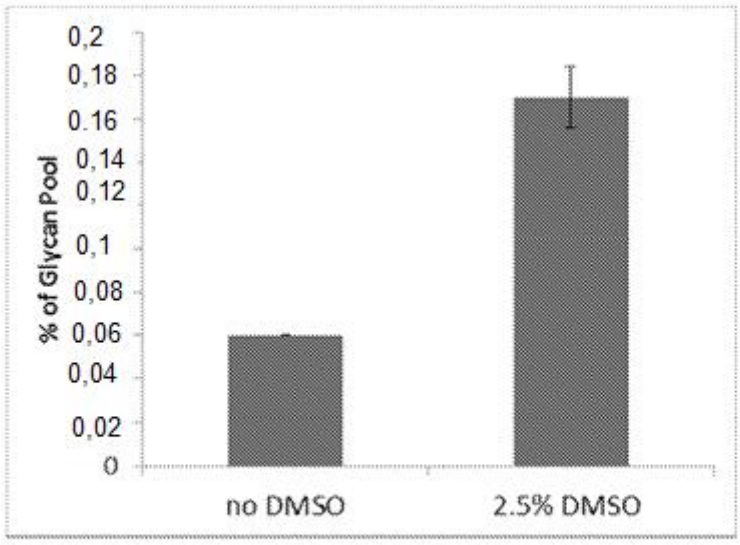
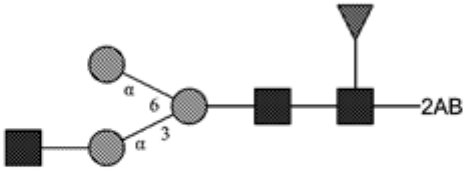

0,2
0,18
0.16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
% of Glycan Pool
no DMSO
2.5% DMSO

FIG. 5B

3,3,1,0,0 Complejo



3,5,1,1,0 Sialilado

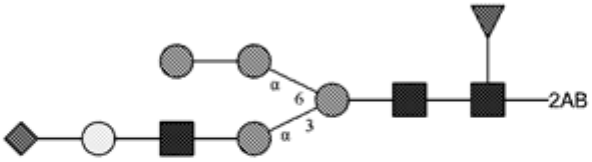


FIG. 6