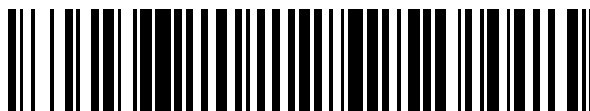


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 274**

51 Int. Cl.:

A61K 38/14	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)
C12P 21/00	(2006.01)
C12Q 1/48	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2014 PCT/US2014/036413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14179601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2014 E 14792116 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2991666**

54 Título: **Glicoproteínas sialiladas**

30 Prioridad:

02.05.2013 US 201361818563 P

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

18.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BHATNAGAR, NAVEEN;
MECCARIELLO, ROBIN;
LANSING, JONATHAN, C.;
ORTIZ, DANIEL;
SARVAIYA, HETAL y
WASHBURN, NATHANIEL**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 802 274 T3

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

DESCRIPCIÓN

Glicoproteínas sialiladas

5 CAMPO

[0001] La presente descripción se refiere en general a la glicobiología y glicoproteínas.

10 ANTECEDENTES

[0002] Las glicoproteínas terapéuticas son una clase importante de productos de biotecnología terapéutica, y las glicoproteínas terapéuticas que contienen Fc, tales como IVIG, fusiones a receptores de Fc y anticuerpos (incluyendo anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos y fragmentos de los mismos) representan la mayoría de productos biológicos terapéuticos.

[0003] El documento WO 2012/113863 A1 describe un procedimiento para producir anticuerpos IgG sialilados.

[0004] El documento US 2011/263828 A1 describe procedimientos para modificar anticuerpos humanos mediante ingeniería de glicanos.

[0005] Joziase et al. (Journal of Biological Chemistry, 1987, 262, 5, 2025-2033) describen la especificidad de la ramificación del CMP-ácido siálico de calostro bovino.

[0006] Huang et al. (Journal of the American Chemical Society, 2012, 134, 29, 12308-12318) describen un procedimiento quimioenzimático para la glicoingeniería de anticuerpos IgG intactos.

25 DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0007] La presente invención proporciona procedimientos, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

[0008] De manera más general, la presente descripción abarca el descubrimiento de un nuevo mecanismo de sialilación por una sialiltransferasa (ST6 Gal-I), que sialila un sustrato (por ejemplo, una glicoproteína que contiene Fc que comprende glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6) de forma ordenada. Específicamente, bajo ciertas condiciones, la sialiltransferasa ST6 cataliza la adición de un ácido siálico en un brazo α 1,3, seguido de la adición de un segundo ácido siálico en un brazo α 1,6, seguido de la eliminación del ácido siálico de un brazo α 1,3. Por consiguiente, la actividad de la sialiltransferasa ST6 se puede controlar usando procedimientos descritos en el presente documento para producir glicoproteínas que tienen patrones de sialilación de ramificación particular.

[0009] En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; y poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción limitada, produciendo así una preparación de glicoproteínas que tienen (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal).

[0010] En algunas partes de la descripción, la sialiltransferasa ST6 tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% o 99% de identidad, o es 100% idéntica, con los residuos de aminoácidos 95-416 de la SEQ ID NO: 1, a la SEQ ID NO: 2, o a la SEQ ID NO: 3.

[0011] En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción limitada son suficientes para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 de un glicano ramificado y no sean suficientes para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado.

[0012] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el aislamiento de la preparación de glicoproteínas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además medir el nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o medir el nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6.

- 5 **[0013]** En algunas partes de la descripción, el nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o el nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 se mide mediante uno o más de: glicanos que se liberan (por ejemplo, glicanos que se liberan enzimáticamente) de las glicoproteínas y la medición de los glicanos liberados; medición de glicanos en glicoproteínas; derivatización de glicanos y medición de glicanos derivados; medición por fluorescencia; medición por espectrometría de masas; y medición por resonancia magnética nuclear
- 10 **[0014]** En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es al menos un 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas realizaciones, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es inferior al 100%, 95%, 90%, 80%, 75%, 70%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.
- 15 **[0015]** En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es inferior al 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o menos de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es al menos un 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.
- 20 **[0016]** En algunas realizaciones, el nivel objetivo es un porcentaje en moles, porcentaje en masa, y/o porcentaje de área.
- 25 **[0017]** En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción limitadas se seleccionan utilizando un procedimiento que comprende: a) poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una primera condición de reacción; b) medir un primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 después de la primera condición de reacción; c) poner en contacto las glicoproteínas con la sialiltransferasa ST6 en presencia de una segunda condición de reacción; y d) medir un segundo nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 después de la segunda condición de reacción; en el que la primera condición de reacción se selecciona como la condición de reacción limitada si el primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 es mayor que el segundo nivel de glicanos ramificados que comprende un ácido siálico en un brazo α 1,3; y/o el primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 es menor que el segundo nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6. En algunas realizaciones, la primera condición de reacción se selecciona de una o más de: un tiempo de reacción más corto en relación con la segunda condición de reacción; una menor concentración de sialiltransferasa ST6 y/o actividad específica en relación con la segunda condición de reacción; una temperatura más baja en relación con la segunda condición de reacción; y una concentración más baja de un donante de ácido siálico en relación con la segunda condición de reacción.
- 30 **[0018]** En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción limitadas se seleccionan de una o más de: un tiempo de reacción más corto en relación con una condición de reacción de control; una menor concentración de sialiltransferasa ST6 y/o actividad específica en relación con una condición de reacción de control; una temperatura más baja en relación con una condición de reacción de control; y una concentración más baja de un donante de ácido siálico en relación con una condición de reacción de control.
- 35 **[0019]** En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; y poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción prolongada, produciendo así una preparación de glicoproteína que tiene (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal).
- 40 **[0020]** En algunas realizaciones, la condición de reacción prolongada es suficiente para que la Sialiltransferasa ST6 sustancialmente elimine un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado disialilado que comprende un ácido siálico en un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6 .
- 45 **[0021]** En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el aislamiento de la preparación de glicoproteína. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además medir un nivel de glicanos ramificados

que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o medir un nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3.

[0022] En algunas partes de la descripción, el nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 se mide mediante uno o más de: glicanos que se liberan (por ejemplo, glicanos que se liberan enzimáticamente) de las glicoproteínas y la medición de los glicanos liberados; medición de glicanos en glicoproteínas; derivatización de glicanos y medición de glicanos derivados; medición por fluorescencia; medición por espectrometría de masas; y medición por resonancia magnética nuclear. En algunas realizaciones, el nivel objetivo es un porcentaje molar, un porcentaje en masa y/o un porcentaje de área.

[0023] En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es inferior al 100%, 95%, 90%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.

[0024] En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es inferior al 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o menos de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es al menos un 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.

[0025] En algunas realizaciones, el nivel objetivo es un porcentaje en moles, porcentaje en masa, y/o porcentaje de área.

[0026] En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción prolongadas se seleccionan utilizando un procedimiento que comprende: a) poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una primera condición de reacción; b) medir un primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 después de la primera condición de reacción; c) poner en contacto las glicoproteínas con la sialiltransferasa ST6 en presencia de una segunda condición de reacción; y d) medir un segundo nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 después de la segunda condición de reacción; en el que la segunda condición de reacción se selecciona como la condición de reacción prolongada si el segundo nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6 es más alto que el primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,6; y/o el segundo nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3 es menor que el primer nivel de glicanos ramificados que comprenden un ácido siálico en un brazo α 1,3. En algunas partes de la descripción, la segunda condición de reacción se selecciona de una o más de: un tiempo de reacción mayor en relación con la primera condición de reacción; una mayor concentración de sialiltransferasa ST6 y/o actividad específica en relación con la primera condición de reacción; una temperatura más alta en relación con la primera condición de reacción; y una mayor concentración de un donante de ácido siálico en relación con la primera condición de reacción.

[0027] En algunas partes de la descripción, la condición de reacción prolongada se selecciona de uno o más de: un tiempo de reacción mayor en relación con una condición de reacción de control; una mayor concentración de sialiltransferasa ST6 y/o actividad específica en relación con una condición de reacción de control; una temperatura más alta en relación con una condición de reacción de control; y una mayor concentración de un donante de ácido siálico en relación con una condición de reacción de control.

[0028] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tiene un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (iii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; y poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción intermedia, produciendo así una preparación de glicoproteínas que tiene (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y en el brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un

ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), y/o (iii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal).

5 **[0029]** En algunas partes de la descripción, la condición de reacción intermedia es suficiente para que la Sialiltransferasa ST6 sustancialmente añada un ácido siálico a un brazo α 1,3 y a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, y no es suficiente para que la Sialiltransferasa ST6 sustancialmente elimine un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado.

10 **[0030]** En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el aislamiento de la preparación de glicoproteína. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además medir un nivel de (i) glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, (ii) glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (iii) glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6.

15 **[0031]** En algunas partes de la descripción, el nivel de (i) glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, (ii) glicanos ramificados monosialilado que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (iii) glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, se mide mediante uno o más de: glicanos que se liberan (por ejemplo, glicanos que se liberan enzimáticamente) de las glicoproteínas y la medición de los glicanos liberados; medición de glicanos en glicoproteínas; derivatización de glicanos y medición de glicanos derivados; medición por fluorescencia; medición por espectrometría de masas; y medición por resonancia magnética nuclear.

20 **[0032]** En algunas realizaciones, el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es inferior al 100%, 95%, 90%, 80%, 75%, 70 %, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de glicanos, glicanos ramificados, o glicanos ramificados sialilados.

30 **[0033]** En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es inferior al 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% , 15%, 10%, 5% o menos de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 es al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% , 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.

35 **[0034]** En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es inferior al 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o menos de glicanos ramificados sialilados. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 es al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos, glicanos ramificados o glicanos ramificados sialilados.

40 **[0035]** En algunas realizaciones, el nivel objetivo es un porcentaje en moles, porcentaje en masa, y/o porcentaje de área.

45 **[0036]** En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; y poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción inicial suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y añada un ácido siálico a un brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) de un glicano ramificado para producir un glicano ramificado disialilado; y poner en contacto el glicano ramificado disialilado con la sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción prolongada, produciendo así una preparación de glicoproteínas que tiene (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,6 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) y/o (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal).

50 **[0037]** En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6,

comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) y en un brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal), (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) y/o (iii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal), comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo $\alpha 1,3$ y un brazo $\alpha 1,6$; y poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción inicial suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) de un glicano ramificado para producir un glicano ramificado monosialilado; y poner en contacto el glicano ramificado monosialilado con la sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción prolongada, produciendo así una preparación de glicoproteínas que tiene (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) y en un brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal), (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) y/o (iii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal).

[0038] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para eliminar un ácido siálico de un glicano ramificado de una región Fc, comprendiendo el glicano ramificado un brazo $\alpha 1,3$ y un brazo $\alpha 1,6$, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un glicano ramificado de una región Fc, comprendiendo el glicano ramificado un brazo $\alpha 1,3$ y un brazo $\alpha 1,6$ y que comprende un ácido siálico en el brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal); poner en contacto el glicano ramificado con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción inicial suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada un ácido siálico al brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) para producir un glicano ramificado disialilado; y poner en contacto el glicano ramificado disialilado con la sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción prolongada, eliminando así el ácido siálico del brazo $\alpha 1,3$ del glicano ramificado.

[0039] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para modular la sialilación de glicanos ramificados con región Fc que comprenden un brazo $\alpha 1,3$ y un brazo $\alpha 1,6$, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una solución de reacción que comprende (i) glicanos ramificados con región Fc que comprenden un brazo $\alpha 1,3$ y un brazo $\alpha 1,6$, (ii) una sialiltransferasa ST6, y (iii) un donante de ácido siálico; e incubar la solución de reacción en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa ST6 catalice la transferencia de un ácido siálico principalmente al brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) solamente, principalmente al $\alpha 1,6$ brazo (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) solamente, o tanto al brazo $\alpha 1,3$ (por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal) como al brazo $\alpha 1,6$ (por ejemplo con un enlace terminal NeuAc- $\alpha 2,6$ -Gal), en el que: a) incubar la solución de reacción en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico principalmente al brazo $\alpha 1,3$ comprende controlar la cinética de reacción de manera que: (i) la velocidad de adición de ácido siálico para el brazo $\alpha 1,3$ ($R_a^{1,3}$) excede la velocidad de adición de ácido siálico para el brazo $\alpha 1,6$ ($R_a^{1,6}$); o (ii) la velocidad de eliminación de ácido siálico para el brazo $\alpha 1,6$ ($R_r^{1,6}$) excede $R_a^{1,6}$; b) incubar la solución de reacción en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico principalmente al brazo $\alpha 1,6$ comprende controlar la cinética de reacción de manera que: (i) $R_a^{1,6}$ exceda $R_r^{1,6}$; y (ii) la velocidad de eliminación de ácido siálico para el brazo $\alpha 1,3$ ($R_r^{1,3}$) finalmente excede $R_a^{1,3}$; o c) incubar la solución de reacción en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ comprende controlar la cinética de reacción de manera que: (i) $R_a^{1,3}$ exceda $R_r^{1,3}$; y (ii) $R_a^{1,6}$ exceda $R_r^{1,6}$; modulando así la sialilación de un glicano ramificado.

[0040] En algunas partes de la descripción, el control de la cinética de reacción comprende uno o más de: modular (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) el tiempo de la reacción; modulando (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) el nivel o actividad de la sialiltransferasa; y modulando (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) las velocidades de $R_r^{1,3}$ o $R_r^{1,6}$ controlando o ajustando la relación del donante de ácido siálico con respecto a un producto de reacción de donante de ácido siálico.

[0041] En algunas partes de la descripción, el donante de ácido siálico es ácido citidina 5'-monofosfo-N-acetil neuramínico y el producto de reacción donante de ácido siálico es citidina 5'-monofosfato.

[0042] En algunas realizaciones, las condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ comprende suplementar el donante siálico al menos una vez durante la reacción. En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ comprende eliminar un producto de reacción de donante siálico al menos una vez durante la reacción. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ comprende suplementar el producto de reacción del donante siálico al menos una vez durante la reacción.

[0043] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la detección de la cinética de reacción.

5 [0044] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la medición de un nivel de glicanos sialilados (por ejemplo, un nivel de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, (ii) un nivel de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (iii) un nivel de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6). En algunas partes de la descripción, el nivel de glicanos sialilados se mide mediante uno o más de: glicanos que se liberan (por ejemplo, glicanos que se liberan enzimáticamente) de las glicoproteínas y medición de los glicanos liberados; medición de glicanos en glicoproteínas; derivatización de glicanos y medición de los glicanos derivados; medición por fluorescencia; medición por espectrometría de masas; y medición por resonancia magnética nuclear.

10 [0045] En algunas partes de la descripción, los glicanos ramificados de la región Fc están en, o se derivan de, una preparación de glicoproteínas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además formular la preparación en un producto farmacológico si la preparación alcanza un nivel objetivo, por ejemplo, un nivel objetivo descrito en el presente documento.

15 [0046] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción limitada suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 de un glicano ramificado y no sea suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, produciendo así una preparación de glicoproteínas sialiladas; y procesar (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, empaquetar) la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple con el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,3 y/o el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6.

20 [0047] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción prolongada suficiente para que la sialiltransferasa ST6 elimine sustancialmente un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado disialilado que comprende un ácido siálico en un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, produciendo así una preparación de glicoproteínas sialiladas; y procesar (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, empaquetar) la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple con el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,6 y/o el nivel objetivo de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3.

25 [0048] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, comprendiendo la preparación (i) un nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, (ii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (iii) un nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; poner en contacto las glicoproteínas con una sialiltransferasa ST6 en presencia de una condición de reacción intermedia suficiente para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 y a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, y no sea suficiente para que la Sialiltransferasa ST6 elimine sustancialmente un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado, produciendo así una preparación de glicoproteínas sialiladas; y procesar (por ejemplo, uno o más de formular, llenar en un recipiente, etiquetar, empaquetar) la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple (i) el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, (ii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o (iii) el nivel objetivo de glicanos ramificados monosialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6.

30 [0049] En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, en algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados sialilados (por ejemplo, el nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, el nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o el nivel de glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) es un nivel de glicanos ramificados sialilados en un producto terapéutico de referencia. En algunas partes de la descripción, el nivel objetivo de glicanos ramificados sialilados es un nivel en un producto de anticuerpo terapéutico de referencia. En algunas

partes de la descripción, el nivel objetivo de los glicanos sialilados es una especificación de 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 Master Batch Record. En algunas partes de la descripción, la especificación del producto es una descripción del producto en una etiqueta de la FDA, una información del médico, una monografía USP o una monografía EP.

[0050] En algunas partes de la descripción, 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.

[0051] En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, la preparación es una preparación de IVIG. En algunas partes de la descripción, la preparación es una preparación de glicoproteínas que contienen Fc recombinante. En algunas partes de la descripción, la glicoproteína recombinante es un anticuerpo recombinante o proteína de fusión Fc.

[0052] En otro aspecto, la descripción presenta una preparación de glicoproteínas producida mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0053] Las presentes enseñanzas descritas en este documento se entenderán de forma más completa a partir de la siguiente descripción de diversas realizaciones ilustrativas, cuando se leen junto con los dibujos adjuntos. Debe entenderse que los dibujos descritos 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 un pentasacárido de núcleo común $(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})(\text{GlcNAc})$ de N-glicanos.

La figura 2 es una ilustración esquemática de una molécula de anticuerpo IgG.

La figura 3 es una representación gráfica de la abundancia relativa de glicanos a diversos tiempos durante una reacción de sialilación con la Sialiltransferasa ST6.

La figura 4 es una ilustración esquemática de un esquema de reacción para la sialiltransferasa ST6 (fucosa: triángulos, N-acetilglucosamina: cuadrados, manosa: círculos oscuros, galactosa: círculos claros, ácido siálico: diamantes).

La figura 5A representa una secuencia de aminoácidos de Sialiltransferasa ST6 de ejemplo (SEQ ID NO: 1). La figura 5B representa una secuencia de aminoácidos de la Sialiltransferasa ST6 de ejemplo (SEQ ID NO: 2). La figura 5C representa una secuencia de aminoácidos de la Sialiltransferasa ST6 de ejemplo (SEQ ID NO: 3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0054] Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en las regiones constantes de su cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen un único sitio de glicosilación unido a N en Asn297 del dominio CH2. Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos unidos a N en las regiones constantes. Para la IgG humana, el oligosacárido central normalmente consiste en $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, con diferentes cantidades de residuos externos. La variación entre las IgG individuales puede producirse mediante la unión de galactosa y/o galactosa-ácido siálico en uno o ambos GlcNAc terminales o mediante la unión de un tercer brazo de GlcNAc (GlcNAc bisectante).

[0055] La presente descripción abarca preparaciones de glicoproteína (por ejemplo, preparaciones de glicoproteínas que contienen regiones Fc (por ejemplo, IVIG, Fc o anticuerpos IgG)) que tienen niveles particulares de glicanos ramificados que están sialilados en un brazo $\alpha 1,3$, un brazo $\alpha 1,6$, o ambos, de los glicanos ramificados en la región Fc (por ejemplo, con un enlace terminal $\text{NeuAc-}\alpha 2,6\text{-Gal}$). Los niveles se pueden medir en una región Fc individual (por ejemplo, el número de glicanos ramificados que están sialilados en un brazo $\alpha 1,3$, un brazo $\alpha 1,6$, o ambos, de los glicanos ramificados en la región Fc), o en la composición general de una preparación de glicoproteínas (por ejemplo, el número o porcentaje de glicanos ramificados que están sialilados en un brazo $\alpha 1,3$, un brazo $\alpha 1,6$ o ambos, de los glicanos ramificados en la región Fc en una preparación de glicoproteínas).

Definiciones

[0056] Tal como se utiliza en este documento, "glicano" es un azúcar, que pueden ser monómeros o polímeros de residuos de azúcar, tales como al menos tres azúcares, y pueden ser lineales o ramificados. Un "glicano" puede incluir residuos de azúcar naturales (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 homopolímeros y heteropolímeros de residuos de azúcar. El término "glicano" también abarca un componente de

glicano de un glicoconjugado (por ejemplo, de una glicoproteína, glicolípido, proteoglicano, etc.). El término también abarca los glicanos libres, incluidos los glicanos que se han escindido o liberado de un glicoconjugado.

[0057] Tal como se utiliza en este documento, el término "glicoproteína" se refiere a una proteína que contiene una cadena principal de péptido unida covalentemente a uno o más restos de azúcar (es decir, glicanos). El resto o restos de azúcar pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. Los restos de azúcar pueden comprender una sola cadena no ramificada de residuos de azúcar o pueden comprender una o más cadenas ramificadas. Las glicoproteínas pueden contener restos de azúcar unidos a O y/o restos de azúcar unidos a N.

[0058] Tal como se utiliza en este documento, el término "preparación de glicoproteínas" se refiere a un conjunto de moléculas de glicoproteína individuales, cada una de las cuales comprende un polipéptido que tiene una secuencia particular de aminoácidos (cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un sitio de glicosilación) y al menos un glicano unido covalentemente al al menos un sitio de glicosilación. Las moléculas individuales de una glicoproteína particular dentro de una preparación de glicoproteínas típicamente tienen 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 al al menos un sitio de glicosilación. Es decir, una preparación de glicoproteínas puede contener solo una glicofoma de una glicoproteína particular, pero más típicamente contiene una pluralidad de glicofomas. Las diferentes preparaciones de la misma glicoproteína pueden diferir en la identidad de las glicofomas presentes (por ejemplo, una glicofoma que está presente en una preparación puede estar ausente de otra) y/o en las cantidades relativas de diferentes glicofomas.

[0059] El término "glicofoma" se utiliza 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 unirse a diferentes glicanos o conjuntos de glicanos, entonces cada versión diferente de la glicoproteína (es decir, donde el polipéptido está unido a un glicano particular o conjunto de glicanos) es referida como un "glicofoma".

[0060] La "glicoproteína de referencia", tal como se utiliza 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) una glicoproteína descrita en el presente documento, por ejemplo, una glicoproteína con la que se compara. En algunas realizaciones, una glicoproteína de referencia es una glicoproteína terapéutica descrita en el presente documento, por ejemplo, una glicoproteína terapéutica aprobada por la FDA.

[0061] Tal como se utiliza en este 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 de cadena pesada variable (H) (abreviada en el presente documento como VH) y una región de cadena ligera variable (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones de la cadena pesada variable (H) y dos regiones de la cadena ligera variables (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 tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda.

[0062] Tal como se utiliza en este documento, el término "región Fc" se refiere a un dímero de dos "polipéptidos Fc", cada "polipéptido Fc" comprendiendo la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. En algunas realizaciones, una "región Fc" incluye dos polipéptidos Fc unidos por uno o más enlaces disulfuro, enlazadores químicos o enlazadores peptídicos. El "polipéptido Fc" se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y también puede incluir parte o la totalidad de la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgG, el "polipéptido Fc" comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 (Cy2) y Cgamma3 (Cy3) y la parte inferior de la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cy2. Aunque los límites del polipéptido Fc pueden variar, el polipéptido Fc de cadena pesada de IgG humana generalmente se define para comprender residuos que comienzan en T223 o C226 o P230, hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat et al. Alabama. (1991, Publicación NIH 91-3242, Servicios Nacionales de Información Técnica, 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, tales como IVIG.

[0063] Tal como se utiliza en este documento, un "sitio de N-glicosilación de una región Fc" se refiere a un residuo de aminoácido dentro de una región Fc al que un glicano se une por N.

[0064] "Nivel predeterminado" o "nivel objetivo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un nivel particular predeterminado de uno o más glicanos particulares, por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α1,6, y/o glicanos

ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo es un valor absoluto o intervalo. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo es un valor relativo. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado es igual o diferente (por ejemplo, mayor o menor que) un nivel de uno o más glicanos particulares (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en una referencia, por ejemplo, un producto de glicoproteína de referencia, o un documento de referencia, tal como una especificación, límite de alerta o master batch record para un producto farmacéutico.

[0065] En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo es un nivel absoluto o intervalo de (por ejemplo, número de moles de) uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en una preparación de glicoproteínas. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo es un nivel o intervalo de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en una preparación de glicoproteínas con respecto al nivel total de glicanos en la preparación de glicoproteínas. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo es un nivel o intervalo de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en una preparación de glicoproteínas con respecto al nivel total de glicanos sialilados en la preparación de glicoproteínas. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado u objetivo se expresa como un porcentaje.

[0066] Para cualquier parámetro dado, en algunas realizaciones, "porcentaje" se refiere al número de moles de un determinado glicano (glicano X) con respecto a los moles totales de glicanos de una preparación. En algunas realizaciones, "porcentaje" se refiere al número de moles de glicano X Fc liberado por PNGasa en relación con los moles totales de glicanos Fc liberados por PNGasa F detectados.

[0067] Por "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 se extrae o 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 citoplasmáticas y el ARN). Un polinucleótido aislado es uno que está separado de otros componentes nucleares (por ejemplo, histonas) y/o de secuencias de ácido nucleico en dirección 5' o 3'. Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos aislada puede estar al menos 60% libre, o al menos 75% libre, o al menos 90% libre, o al menos 95% libre de otros componentes presentes en el entorno natural de la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos indicadas.

[0068] Tal como se utiliza 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 o ARN de origen genómico o sintético, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y representan la cadena sentido o antisentido.

[0069] Tal como se utiliza en este documento, "polipéptido" (o "secuencia de aminoácidos" o "proteína") se refiere a un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia de proteína, y fragmentos o porciones de los mismos, y a moléculas de origen natural o sintéticos. "Secuencia de aminoácidos" y términos similares, tales 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 mencionada.

[0070] El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad (por ejemplo, dosis) eficaz en el tratamiento de un paciente, que tiene un trastorno o afección descrita en el presente documento. También debe entenderse en el presente documento que una "cantidad farmacéuticamente efectiva" puede interpretarse como una cantidad que proporciona un efecto terapéutico deseado, ya sea en una dosis o en cualquier dosis o vía, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

[0071] El término "tratamiento" o "tratar", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, manera, y/o modo eficaz para mejorar una afección, 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 por un experto en la materia. Una cantidad eficaz, manera o modo pueden variar según el sujeto y puede adaptarse al sujeto.

[0072] Tal como se utiliza en el presente documento, una "secuencia característica" es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos, y por lo tanto puede ser utilizada por los expertos en la técnica para definir los miembros de la familia.

[0073] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idénticas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% similares.

[0074] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "identidad" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, se puede realizar alineando las dos secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y segunda secuencias de ácido nucleico para una alineación óptima y las secuencias no idénticas pueden descartarse para fines de comparación). En ciertas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada para fines de comparación es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, a al menos 95%, o sustancialmente 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos de peso PAM120 , una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede, alternativamente, determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Sialiltransferasa ST6" se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia característica de y/o muestra al menos 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95 %, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad con una proteína involucrada en la transferencia de un ácido siálico a una galactosa terminal de un glicano a través de un enlace α 2,6 (por ejemplo, ST6 Gal-I). En la técnica se conoce una amplia variedad de secuencias de Sialiltransferasa ST6, tales como las descritas en el presente documento; en algunas partes de la descripción, una Sialiltransferasa ST6 comparte al menos una secuencia característica de y/o muestra el grado especificado de identidad de secuencia global con una de las Sialiltransferasa ST6s establecidas en el presente documento (cada una de las cuales puede considerarse una Sialiltransferasa ST6 de "referencia"). En algunas partes de la descripción, una Sialiltransferasa ST6, tal como se describe en el presente documento, comparte al menos una actividad biológica con una Sialiltransferasa ST6 de referencia, tal como se establece en el presente documento. En algunas partes de la descripción, la actividad biológica compartida se relaciona con la transferencia de un ácido siálico a un glicano.

Glicoproteínas

[0076] En este documento se describen preparaciones (por ejemplo, preparaciones terapéuticas) de polipéptidos (por ejemplo, glicoproteínas), y procedimientos para preparar y usar tales preparaciones, que tienen niveles particulares de glicanos ramificados que tienen sialilación en un brazo α 1,3, un brazo α 1,6, y/o en ambos brazos. Las glicoproteínas incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de agentes hematológicos (que incluyen, por ejemplo, eritropoyetina, factores de coagulación de la sangre, etc.), interferones, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, enzimas y hormonas. La identidad de una glicoproteína particular no pretende limitar la presente descripción, y una preparación descrita en el presente documento puede incluir cualquier glicoproteína de interés, por ejemplo, una glicoproteína que tiene una región Fc.

[0077] Una glicoproteína descrita en este documento puede incluir un dominio de unión a la 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). Ejemplos de dianas moleculares (por ejemplo, antígenos) para las 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), receptores HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) o HER4 (ErbB4); receptores de macrófagos, tales como CR1g; factores de necrosis tumoral, tales como TNF α o TRAIL/Apo-2; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina α v β 3, incluidas sus subunidades α o β (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento y receptores, tales como EGF, FGFR (por ejemplo, FGFR3) y VEGF; IgE; citoquinas, tales como IL1; receptores de

5 citoquinas, tales como el receptor de IL2; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C; neutropilinas; efrinas y receptores; netrinas y receptores; slit y receptores; quimiocinas y receptores de quimiocinas, tales como CCL5, CCR4, CCR5; beta amiloide; factores del complemento, tales como el factor del complemento D; lipoproteínas, tales como LDL oxidada (oxLDL); linfotoxinas, tales como la linfotoxina alfa (LTa). Otros dianas moleculares incluyen Tweak, B7RP-1, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), esclerostina, c-kit, Tie-2, c-fms y anti-M1.

Polipéptidos de referencia

10 **[0078]** En algunas partes de la descripción, los procedimientos descritos en este documento son útiles para controlar la sialilación de un polipéptido de referencia (por ejemplo, una glicoproteína de referencia). En algunas partes de la descripción, las preparaciones de polipéptidos (por ejemplo, glicoproteína) descritas en el presente documento tienen niveles predeterminados u objetivos de glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6 y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6), donde los niveles predeterminados son sustancialmente similares o diferentes de (por ejemplo, niveles superiores o inferiores a) glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en un producto de polipéptido de referencia (por ejemplo, producto de glicoproteína). Los productos de glicoproteína 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 (Maris®, Novartis), brentuximab vedotin (Adcetris®, Seattle Genetics), certolizumab (CIMZIA®, UCB, Bruselas, Bélgica), cetuximab (Erbix®, Merck-Serono), daclizumab (Zenapax®, Hoffmann-La Roche), denileukin difitox (Ontak®, Eisai), denosumab (Prolia®, Amgen; Xgeva®, Amgen), eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals), efalizumab (Raptiva®, Genentech), etanercept (Enbrel®, Amgen-Pfizer), gemtuzumab (Mylotarg®, Pfizer), golimumab (Simponi®, Janssen), ibritumomab (Zevalin®, Spectrum Pharmaceuticals), infliximab (Remicade®, Centocor), ipilimumab (Yervoy™, Bristol-Myers Squibb), muromonab (Orthoclone OKT3®, Janssen-Cilag), natalizumab (Tysabri®, Biogen Idec, Elan), ofatumumab (Arzerra®, GlaxoSmithKline), omalizumab (Xolairumab)®, Novartis), palivizumab (Synagis®, MedImmune), panitumumab (Vectibix®, Amgen), ranibizumab (Lucentis®, Genentech), riloncept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals), rituximab (MabThera®, Roche), tocilizumab (Acciltraumab) Genentech RoActemra, Hoffman-La Roche) tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline) y trastuzumab (Herceptin®, Roche).

35 **[0079]** En algunas partes de la descripción, un nivel de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en un producto de polipéptido de referencia se determina analizando una o más preparaciones (por ejemplo, uno o más lotes) del polipéptido de referencia. En algunas partes de la descripción, un nivel de uno o más glicanos (por ejemplo, glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,6, y/o glicanos ramificados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6) en un producto de polipéptido 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 de polipéptido de referencia). En algunas partes de la descripción, un nivel de uno o más glicanos es un rango (por ejemplo, que abarca desde un nivel más bajo del uno o más glicanos hasta un nivel más alto del uno o más glicanos) en dos o más lotes del producto de polipéptido de referencia.

Glicosilación unida a N

50 **[0080]** Las cadenas de oligosacáridos unidos a N se agregan a una proteína en la 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 azúcares) al grupo amino en la cadena lateral de un residuo 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 residuos de glucosa, 9 de manosa y 2 de N-acetilglucosamina. Esta cadena inicial de oligosacáridos se puede recortar mediante enzimas de glucosidasa específicas en el retículo endoplásmico, lo que da como resultado un oligosacárido de núcleo corto y ramificado compuesto por dos N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa (representados en la Figura 1, unidos a un residuo de asparagina). Una de las ramificaciones se conoce en la técnica como el "brazo α 1,3", y la segunda ramificación se conoce como el "brazo α 1,6", tal como se indica en la Figura 1.

65 **[0081]** Los N-glicanos se pueden subdividir en tres grupos distintos llamados "tipo de alto contenido en manosa", "tipo híbrido" y "tipo complejo", con un núcleo de pentasacárido común (Man (alfa1,6) - (Man (alfa1,3)) - Man (beta1,4) - GlcpNAc (beta 1,4) -GlcNAc (beta 1, N) -Asn) que aparece en los tres grupos.

[0082] Después del procesamiento inicial en el retículo endoplasmático, la glicoproteína se transporta al Golgi, donde puede tener lugar un procesamiento adicional. Si el glicano se transfiere al Golgi antes de recortarse por completo a la estructura central del pentasacárido, se obtiene un "glicano con alto contenido de manosa".

[0083] Adicionalmente o alternativamente, una o más unidades de monosacáridos de N-acetilglucosamina se pueden añadir a las subunidades básicas de manosa para formar un "complejo de glicano". La galactosa se puede agregar a las subunidades de N-acetilglucosamina, y las subunidades de ácido siálico se pueden agregar a las subunidades de galactosa, lo que resulta en cadenas que terminan con cualquiera de un residuo de ácido siálico, galactosa o N-acetilglucosamina. Además, se puede agregar un residuo de fucosa a un residuo de N-acetilglucosamina del oligosacárido central. Cada una de estas adiciones es catalizada por glicosil transferasas específicas, conocidas en la técnica.

[0084] Los ácidos siálicos son una familia de monosacáridos de 9 carbonos con estructuras de anillo heterocíclicas. Llevan una carga negativa a través de un grupo de ácido carboxílico unido al anillo, así como otras estructuras químicas que incluyen grupos N-acetilo y N-glicolilo. Los dos tipos principales de residuos de sialilo que se encuentran en las glicoproteínas producidas en los sistemas de expresión de mamíferos son el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) y el ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Estos generalmente aparecen como estructuras terminales unidas a residuos de galactosa (Gal) en los extremos no reductores de los glicanos unidos a N y O. Las configuraciones de enlace glicosídico para estos grupos sialilo pueden ser $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$.

[0085] Los "glicanos híbridos" comprenden características tanto de glicanos complejos como de alto contenido en manosa. Por ejemplo, una ramificación de un glicano híbrido puede comprender principalmente o exclusivamente residuos manosa, mientras que otra ramificación puede comprender N-acetilglucosamina, ácido siálico y/o azúcares de galactosa.

Glicosilación unida a N en anticuerpos

[0086] 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 (ver 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 (ver Arnold et al., J. Biol. Chem. 280: 29080-29087 (2005); Mattu et al., J. Biol. Chem. 273: 2260-2272 (1998); Nettleton et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 107: 328-329 (1995)).

[0087] Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos unidas a N en las regiones constantes. Por ejemplo, IgG tiene un solo carbohidrato biantenarico unido 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 Fc γ R (ver Jefferis et al., Immunol. Rev. 163: 59-76 (1998) y Wright et al., Trends Biotech 15: 26-32 (1997)). Para la IgG humana, el oligosacárido central normalmente consiste en GlcNAc₂Man₃GlcNAc, con diferentes cantidades de residuos externos. La variación entre la IgG individual puede tener lugar mediante la unión de galactosa y/o galactosa-ácido siálico en uno o ambos GlcNAc terminales o mediante la unión de un tercer brazo de GlcNAc (GlcNAc bisectante) y/o la unión de fucosa.

Anticuerpos

[0088] La estructura básica de un anticuerpo IgG se ilustra en la Figura 2. Tal como se muestra en la Figura 2, 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 de anticuerpo que se encuentran en cada anticuerpo individual. Estas se conocen como regiones pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL). Los otros dominios de cada cadena son relativamente invariables en la secuencia de aminoácidos y se conocen como regiones pesadas constantes (CH) y ligeras constantes (CL). Tal como se muestra en la Figura 2, 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).

[0089] 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, Fv de cadena única (scFv), Fv ligado 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.

[0090] El término "fragmento Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de una región Fc que conserva una función y/o actividad Fc descritas en este documento, tal como la unión a un receptor de Fc. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos que incluyen un sitio de glicosilación unido a N de una región Fc (por ejemplo, Asn297 de una cadena pesada de IgG o sitios homólogos de otros isotipos de anticuerpos), tal como un dominio CH2. El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal 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 fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento scFv, un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando 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.

[0091] Las glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos), o fragmentos de los mismos, para su uso como sustratos para una Sialiltransferasa ST6 descritas en este documento, pueden producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de glicoproteínas (por ejemplo, anticuerpos) (véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Los anticuerpos quiméricos se pueden producir usando procedimientos descritos en, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229: 1202, y los anticuerpos humanizados mediante procedimientos descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N ° 6.180.370.

[0092] Los anticuerpos de referencia adicionales que se describen en el presente documento son anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multivalentes, tal como se describe en, por ejemplo, Segal et al., J. Immunol. Procedimientos 248: 1-6 (2001); y Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

Conjugados de glicoproteínas

[0093] La descripción incluye glicoproteínas (o regiones Fc o fragmentos Fc que contienen uno o más sitios de N-glicosilación de los mismos) que se conjugan o fusionan a uno o más restos heterólogos. Los restos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. En algunos casos, un conjugado de glicoproteína es una proteína de fusión que comprende un péptido, polipéptido, armazón de proteínas, scFv, dsFv, diacuerpo, Tandab o un anticuerpo mimético fusionado a una región Fc, tal como una región Fc glicosilada. Una proteína de fusión puede incluir una región enlazadora que conecta una región Fc con 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 y Sauer (1996)).

[0094] Los productos conjugados de glicoproteína de referencia no limitantes de ejemplo incluyen abatacept (Orencia®, Bristol-Myers Squibb), aflibercept (Eylea®, Regeneron Pharmaceuticals), alefacept (Amevive®, Astellas Pharma), belatacept (Nulojix®, Bristol-Myers Squibb), denileukin diftiox (Ontak®, Eisai), etanercept (Enbrel®, Amgen-Pfizer) y riloncept (Arcalyst®, Regeneron Pharmaceuticals).

[0095] En algunos casos, un conjugado de glicoproteínas incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más de sitios de N-glicosilación del mismo) conjugada 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.

[0096] En algunos casos, un conjugado de glicoproteínas incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilación del mismo) conjugada con una o más secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. Una secuencia de aminoácidos marcadora particular es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311). Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., 1984, Cell 37: 767) y la etiqueta "Flag".

[0097] En otros casos, un conjugado de glicoproteína incluye una región Fc (o un fragmento Fc que contiene uno o más sitios de N-glicosilación de los mismos) conjugada con un agente de diagnóstico o detectable. Dichas proteínas de fusión pueden ser útiles para controlar o pronosticar el desarrollo o la progresión de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden lograr mediante el acoplamiento de una glicoproteína a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, varias enzimas, tales como, pero no se limitan 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 limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o

ficoeritina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, entre otros, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), galio (^{68}Ga , ^{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 utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos.

[0098] Las técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidos (véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (Eds.), pág. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)).

Polipéptidos de sialiltransferasa

[0099] Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento incluyen el uso de una enzima sialiltransferasa, por ejemplo, una α 2,6 sialiltransferasa (por ejemplo, ST6 Gal-I). Se conocen varias Sialiltransferasa ST6s en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, Takashima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1155-1167 (2008); Weinstein et al., *J. Biol. Chem.* 262: 17735 -17743 (1987)). ST6 Gal-I cataliza la transferencia de ácido siálico de un donante de ácido siálico (por ejemplo, ácido citidina 5'-monofosfo-N-acetil neuramínico) a un residuo de galactosa terminal de glicanos a través de un enlace α 2,6. El producto de reacción del donante de ácido siálico es citidina 5'-monofosfato. En algunas realizaciones, una Sialiltransferasa ST6 tiene o incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o en los residuos de aminoácidos 95-416 de SEQ ID NO: 1, o un elemento de secuencia característico de las mismas o en las mismas. En algunas partes de la descripción, una Sialiltransferasa ST6 tiene al menos 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88 %, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, o 70% de identidad de secuencia global con una o más de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o residuos de aminoácidos 95-416 de SEQ ID NO: 1. Alternativa o adicionalmente, en algunas partes de la descripción, una Sialiltransferasa ST6 incluye al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 o 150 o más residuos de aminoácidos contiguos encontrada en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o residuos de aminoácidos 95-416 de SEQ ID NO: 1.

[0100] En algunas partes de la descripción, una Sialiltransferasa ST6 difiere de una secuencia de aminoácidos, tal como se establece en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o en los residuos de aminoácidos 95-416 de SEQ ID NO: 1, o elementos de secuencia característicos de las mismas o en las mismas, en uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas partes de la descripción, la diferencia es una sustitución conservativa o no conservativa de uno o más residuos de aminoácidos. Las sustituciones conservativas son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Las sustituciones conservativas típicas son los siguientes reemplazos: reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, por otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina por una treonina o viceversa; reemplazo de un residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, por otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que lleva un grupo amida, tal como asparagina y glutamina, por otro residuo que lleva un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, por otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, por otro residuo aromático.

[0101] En algunas partes de la descripción, un polipéptido de sialiltransferasa ST6 incluye un grupo sustituyente en uno o más residuos de aminoácidos. Aún otros polipéptidos útiles están asociados con (por ejemplo, fusionados, unidos o acoplados a) otro resto (por ejemplo, un péptido o molécula). Por ejemplo, un polipéptido de Sialiltransferasa ST6 puede fusionarse, unirse o acoplarse a una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia de proproteína, un segundo polipéptido o una secuencia que facilita la purificación, enriquecimiento o estabilización del polipéptido).

Procedimientos de glicoproteínas sialilantes

[0102] La sialiltransferasa ST6 Gal-I cataliza la transferencia de ácido siálico desde un donante de ácido siálico (por ejemplo, ácido citidina 5'-monofosfo-N-acetil neuramínico) a un residuo galactosa terminal de glicanos a través de un enlace α 2,6. La presente descripción explota el descubrimiento de que la sialiltransferasa ST6 cataliza la transferencia de ácido siálico a glicanos ramificados (por ejemplo, glicanos ramificados con Fc) que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6 de forma ordenada. Tal como se muestra en la Figura 4, la sialiltransferasa ST6 transfiere un ácido siálico a un brazo α 1,3 de un glicano ramificado, que puede ser seguido por la transferencia de un segundo ácido siálico a un brazo α 1,6 (produciendo un glicano ramificado disialilado), y puede ser seguido además por la eliminación del ácido siálico de un brazo α 1,3 (produciendo un glicano ramificado que tiene un ácido siálico en un brazo α 1,6). Por consiguiente, controlando y/o modulando la actividad (por ejemplo, la cinética) de la sialiltransferasa ST6, se pueden producir glicoproteínas que tienen patrones de sialilación particulares.

[0103] Cualquier parámetro generalmente conocido que afecte a la cinética enzimática puede controlarse y/o modularse para producir una preparación de glicoproteínas que tenga un nivel predeterminado u objetivo de ácido siálico en un brazo α 1,3 de un glicano ramificado, en un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, y/o en un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6 de un glicano ramificado. Por ejemplo, el tiempo de reacción, la concentración de sialiltransferasa ST6 y/o la actividad específica, la concentración de glicano ramificado, la concentración de donantes de ácido siálico, la concentración del producto de reacción de donantes de ácido siálico, el pH, la composición del tampón y/o la temperatura pueden controlarse y/o modularse para producir una preparación de glicoproteínas que tenga un nivel deseado de sialilación (por ejemplo, sialilación de brazo α 1,3 y/o brazo α 1,6).

[0104] En algunas partes de la descripción, para sialilar preferentemente un brazo α 1,3 de glicanos ramificados (por ejemplo, que tienen un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6), los glicanos ramificados se ponen en contacto in vitro con una sialiltransferasa ST6 bajo condiciones de reacción limitadas. Dichas condiciones de reacción limitadas se seleccionan de manera que la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 aumenta en relación con la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (por ejemplo, la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,3 (" $R_a^{1,3}$ ") excede la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (" $R_a^{1,6}$ "). En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción limitadas se seleccionan adicionalmente de tal manera que la eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 se aumenta en relación con la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (por ejemplo, la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 (" $R_r^{1,6}$ ") excede la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (" $R_a^{1,6}$ "). Las condiciones de reacción limitadas pueden incluir, por ejemplo, tiempo de reacción reducido, concentración y/o actividad enzimática reducidas, cantidad reducida de glicanos ramificados, nivel reducido de donante de ácido siálico y/o temperatura reducida.

[0105] En algunas partes de la descripción, para sialilar preferentemente un brazo α 1,6 de glicanos ramificados (por ejemplo, que tienen un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6), los glicanos ramificados pueden ponerse en contacto in vitro con una sialiltransferasa ST6 bajo condiciones de reacción prolongadas. Dichas condiciones de reacción prolongadas se seleccionan de manera que la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 se aumente en relación con la eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 (por ejemplo, la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (" $R_a^{1,6}$ ") exceda la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 (" $R_r^{1,6}$ "). En algunas realizaciones, las condiciones de reacción prolongadas se seleccionan adicionalmente de manera que, después de las condiciones iniciales que aumentan la adición de ácido siálico a un brazo α 1,3, las condiciones se prolongan de tal manera que la eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 finalmente aumenta en relación a la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 (por ejemplo, la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 (" $R_r^{1,3}$ ") excede la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,3 (" $R_a^{1,3}$ "). Las condiciones de reacción prolongadas pueden incluir, por ejemplo, mayor tiempo de reacción, mayor concentración y/o actividad enzimática, mayor cantidad de glicanos ramificados, mayor nivel de donante de ácido siálico y/o mayor temperatura.

[0106] En algunas partes de la descripción, para sialilar preferentemente tanto un brazo α 1,3 como un brazo α 1,6 de glicanos ramificados (por ejemplo, que tienen un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6), se ponen en contacto glicanos ramificados in vitro con una sialiltransferasa ST6 en condiciones de reacción intermedias. Dichas condiciones de reacción intermedias se seleccionan de modo que la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 aumente en relación con la eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 (por ejemplo, la velocidad de transferencia de un ácido siálico a un brazo α 1,3 (" $R_a^{1,3}$ ") exceda la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 (" $R_r^{1,3}$ "). En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción intermedias se seleccionan adicionalmente de modo que la adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 aumenta en relación con la eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 (por ejemplo, la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 (" $R_a^{1,6}$ ") excede la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 (" $R_r^{1,6}$ "). Las condiciones de reacción intermedias pueden incluir, por ejemplo, tiempo de reacción intermedio, concentración y/o actividad enzimática intermedias, cantidad intermedia de glicanos ramificados, nivel intermedio de donante de ácido siálico y/o temperatura intermedia. En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción intermedias incluyen además suplementar el donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción. En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción intermedias incluyen además eliminar un producto de reacción del donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción. En algunas partes de la descripción, las condiciones de reacción intermedias incluyen además suplementar el producto de reacción del donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción.

[0107] En algunas partes de la descripción, una glicoproteína, por ejemplo, un anticuerpo glicosilado, se sialila después de que se produce la glicoproteína. Por ejemplo, una glicoproteína puede expresarse de forma recombinante en una célula huésped (tal como se describe en el presente documento) y purificarse usando procedimientos estándar. La glicoproteína purificada se pone en contacto con una sialiltransferasa ST6 (por ejemplo, una sialiltransferasa ST6 purificada y expresada de forma recombinante) en presencia de las condiciones de reacción, tal como se describe en el presente documento. En ciertas partes de la descripción, las condiciones incluyen poner en contacto la glicoproteína purificada con una sialiltransferasa ST6 en presencia de un donante de ácido siálico, por ejemplo, ácido citidina 5'-monofosfo-N-acetil neuramínico, manganeso y/u otros iones metálicos divalentes. En algunas realizaciones, se usa IVIG en un procedimiento de sialilación descrito en el presente documento.

[0108] En algunas partes de la descripción, la sialilación quimioenzimática se usa para sialilar glicoproteínas. Brevemente, este procedimiento implica la sialilación de un glicano ramificado purificado, seguido de la incorporación del glicano ramificado sialilado en bloque sobre un polipéptido para producir una glicoproteína sialilada.

[0109] Un glicano ramificado puede sintetizarse de novo usando técnicas estándar o puede obtenerse a partir de una preparación de glicoproteínas (por ejemplo, una glicoproteína recombinante, Fc o IVIG) usando una enzima apropiada, tal como una endoglucosidasa (por ejemplo, EndoH o EndoF). Después de la sialilación del glicano ramificado, el glicano ramificado sialilado puede conjugarse con un polipéptido usando una enzima apropiada, tal como una transglucosidasa, para producir una glicoproteína sialilada.

[0110] En un procedimiento de ejemplo, se obtiene un N-glicano ramificado purificado a partir de una glicoproteína (por ejemplo, una preparación de glicoproteínas, por ejemplo, IVIG) usando una endoglucosidasa. El N-glicano ramificado se activa químicamente en el extremo reductor para formar un intermedio químicamente activo. El N-glicano ramificado se procesa, se recorta y/o se glucosila adicionalmente usando las glucosidasas conocidas apropiadas. El glicano ramificado se sialila a continuación usando una sialilación ST6, tal como se describe en el presente documento. Después de la ingeniería, el N-glicano ramificado deseado se transfiere a una glicoproteína usando una transglucosidasa (tal como una transglucosidasa en la que la actividad glucosídica se ha atenuado mediante ingeniería genética).

[0111] En algunas partes de la descripción, un glicano ramificado utilizado en los procedimientos descritos en el presente documento es un glicano ramificado galactosilado (por ejemplo, incluye un residuo de galactosa terminal). En algunas partes de la descripción, un glicano ramificado se galactosila antes de ser sialilado usando un procedimiento descrito en este documento. En algunas partes de la descripción, un glicano ramificado se pone en contacto primero con una galactosiltransferasa (por ejemplo, una beta-1,3-galactosiltransferasa) y posteriormente se pone en contacto con una sialiltransferasa ST6, tal como se describe en este documento. En algunas partes de la descripción, un glicano galactosilado se purifica antes de ponerse en contacto con una sialiltransferasa ST6. En algunas partes de la descripción, un glicano galactosilado no se purifica antes de ponerse en contacto con una sialiltransferasa ST6. En algunas partes de la descripción, un glicano ramificado se pone en contacto con una galactosiltransferasa y una sialiltransferasa ST6 en un solo paso.

[0112] En algunas partes de la descripción, una célula huésped se modifica genéticamente para expresar una glicoproteína descrita en el presente documento y una o más enzimas sialiltransferasas, por ejemplo, una sialiltransferasa ST6. En algunas partes de la descripción, la célula huésped está genéticamente modificada para expresar además una galactosiltransferasa. La célula huésped modificada genéticamente puede cultivarse en condiciones suficientes para producir una glicoproteína sialilada particular. Por ejemplo, para producir glicoproteínas preferentemente sialiladas en brazos α 1,3 de glicanos ramificados, una célula huésped puede ser modificada genéticamente para expresar un nivel relativamente bajo de sialiltransferasa ST6, mientras que para producir glicoproteínas preferentemente sialiladas en brazos α 1,6 de glicanos ramificados, una célula huésped puede ser modificada genéticamente para expresar un nivel relativamente alto de sialiltransferasa ST6. En algunas partes de la descripción, para producir glicoproteínas preferentemente sialiladas en brazos α 1,3 de glicanos ramificados, se puede cultivar una célula huésped genéticamente modificada en un nivel relativamente bajo de donante de ácido siálico, mientras que para producir glicoproteínas preferentemente sialiladas en brazos α 1,6 de glicanos ramificados, una célula huésped genéticamente modificada puede cultivarse en un nivel relativamente alto de donante de ácido siálico.

Expresión génica recombinante

[0113] De acuerdo con la presente descripción, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la capacidad de la técnica. Dichas técnicas se describen en la literatura (ver, por ejemplo, Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cuarta edición (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I- IV (DN Glover ed. 1995; 1996); Oligonucleotide synthesis (MJ Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridisation (BD Hames & SJ Higgins eds. (1985)); Transcription and Translation (BD Hames & SJ Higgins, eds. (1984)); Culture of Animal Cells, Sexta edición (RI Freshney, ed. (2010)); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, Second Edition (1988); FM Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1995).

[0114] La expresión recombinante de un gen, tal como un gen que codifica un polipéptido, tal como un anticuerpo o una sialiltransferasa descritos en este documento, 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 el sector. Se pueden usar procedimientos conocidos para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de polipéptidos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y

recombinación genética in vivo.

[0115] Un vector de expresión puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas pueden cultivarse a continuación mediante técnicas convencionales para producir polipéptidos.

[0116] Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.807.715). Dichos sistemas de expresión del huésped pueden usarse para producir polipéptidos y, cuando se desee, posteriormente purificarse. Dichos sistemas de expresión del huésped incluyen microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de polipéptidos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NSO y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, promotor tardío de adenovirus; promotor del virus vaccinia 7.5K).

[0117] Para sistemas bacterianos, se pueden usar varios vectores de expresión, que incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12: 1791); vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST).

[0118] Para la expresión en células huésped de mamífero, se pueden utilizar sistemas de expresión basados en virus (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 1: 355-359). La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544).

[0119] Además, se puede elegir una cepa de la célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos del polipéptido expresado. Dichas células incluyen, por ejemplo, líneas celulares de mamífero establecidas y líneas celulares de insecto, células animales, células fúngicas y células de levadura. Las células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, MUY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NSO (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), células CRL7030 y HsS78Bst.

[0120] Para la producción a largo plazo, con alto rendimiento, de proteínas recombinantes, las células huésped se diseñan para expresar de forma estable un polipéptido. Las células huésped pueden transformarse con ADN controlado mediante elementos de control de expresión apropiados conocidos en la técnica, que incluyen promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación y marcadores seleccionables. Pueden usarse procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar un clon recombinante deseado.

[0121] Una vez que se produce una glicoproteína descrita en el presente documento mediante expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Por ejemplo, un anticuerpo puede aislarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente columnas de afinidad, tales como la columna de proteína A con columnas de cromatografía, procedimientos de filtración, ultrafiltración, "salting-out" y diálisis (ver Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Además, tal como se describe en el presente documento, una glicoproteína puede fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos para facilitar la purificación. Las glicoproteínas que tienen cadenas de azúcar deseadas se pueden separar con una columna de lectina mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, WO 02/30954).

Evaluación de glicanos

[0122] Los glicanos de glicoproteínas pueden evaluarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la sialilación de composiciones de glicano (por ejemplo, nivel de glicanos ramificados que se sialilan en un

brazo α 1,3 y/o un brazo α 1,6) puede caracterizarse usando procedimientos descritos en, por ejemplo, Barb, Biochemistry 48: 9705-9707 (2009); Anumula, J. Immunol. Methods 382: 167-176 (2012); Gilar et al., Analytical Biochem. 417: 80-88 (2011); Wuhrer et al., J. Chromatogr. B. 849: 115-128 (2007). En algunas realizaciones, además de la evaluación de la sialilación de glicanos, se evalúan uno o más parámetros descritos en la Tabla 1.

- 5 **[0123]** En algunos casos, la estructura y composición de glicano, tal como se describe en el presente documento, se analizan, por ejemplo, mediante uno o más de procedimiento enzimático, cromatográfico, espectrometría de masas (MS), cromatográfico seguido 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 glicoproteínas 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 la PNGasa F. Los procedimientos cromatográficos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de intercambio aniónico fuerte usando detección amperométrica pulsada (SAX-PAD), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de ultrarendimiento (UPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna de amida y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de espectrometría de masas (MS) incluyen, pero no se limitan a, MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, espectrometría de masas por ionización por desorción asistida por matriz (MALDI-MS), espectrometría de masas por transformación de Fourier (FTMS), separación por movilidad iónica con espectrometría de masas (IMS-MS), disociación por transferencia de electrones (ETD-MS) y combinaciones de los mismos. Los procedimientos electroforéticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, electroforesis capilar (CE), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de transferencia Western usando anticuerpos que reconocen estructuras de glicano específicas y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de resonancia magnética nuclear (RMN) incluyen, pero no se limitan a, RMN unidimensional (RMN 1D), RMN bidimensional (RMN 2D), RMN giratorio de ángulo magnético con espectroscopía de correlación (RMN COSY), RMN con espectroscopía correlacionada total (RMN TOCSY), RMN de coherencia cuántica simple heteronuclear (RMN HSQC), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (RMN HMQC), RMN con espectroscopía de efecto de sobrecarga nuclear rotatoria (RMN ROESY), espectroscopía de efecto de sobrecarga nuclear (NOESY-NMR), y sus combinaciones.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 **[0124]** En algunos casos, las técnicas descritas en este 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 descripción usando uno o más procedimientos disponibles (para dar solo algunos ejemplos, ver Anumula, Anal. Biochem., 350 (1): 1, 2006; Klein et al., Anal. Biochem., 179: 162, 1989; y/o Townsend, RR Carbohydrate Analysis "Cromatografía líquida de alto rendimiento y electroforesis capilar., Ed. Z. El 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; WO2010/071818; ; WO2010/085251; WO2011/069056; y WO2011/127322. Por ejemplo, en algunos casos, los glicanos se caracterizan usando uno o más de los procedimientos cromatográficos, procedimientos electroforéticos, procedimientos de resonancia magnética nuclear y combinaciones de los mismos.
- 35
- 40 En algunos casos, los procedimientos para evaluar uno o más parámetros específicos de la proteína diana, por ejemplo, en una preparación de glicoproteínas, por ejemplo, uno o más de los parámetros descritos en este documento, pueden realizarse mediante uno o más de los siguientes procedimientos.
- 45 **[0125]** En algunos casos, los procedimientos para evaluar uno o más parámetros específicos de la proteína diana, por ejemplo, en una preparación de glicoproteínas, por ejemplo, uno o más de los parámetros descritos en el presente documento, se pueden realizar mediante uno o más de los siguientes procedimientos.

Tabla 1: Procedimientos de ejemplo de evaluación de parámetros:

Procedimientos(s)	Literatura relevante	Parámetro
Espectrometría de masas C18 UPLC*	Chen y Flynn, Anal. Biochem., 370: 147-161 (2007) Chen y Flynn, J. Am. Soc. MassSpectrom., 20: 1821-1833 (2009)	Glicano (s) (por ejemplo, glicano unido a N, glicano unido a N expuesto, detección de glicanos, identificación y caracterización de glicanos; glicación específica del sitio; detección de glicofoma (por ejemplo, parámetros 1- 7); porcentaje de glicosilación; y/o aglicosilo)
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008) Yan et al., J. Chrom. A., 1164: 153-161 (2007) Chelius et al., Anal. Chem., 78:	Lisina C-terminal

	2370-2376 (2006) Miller et al., J. Pharm. Sci., 100: 2543-2550 (2011)	
LC-MS (reductor/no reductor/alquilado)	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008) Goetze et al., Glycobiol., 21: 949-959 (2011)	
Cromatografía de intercambio de cationes débiles (WCX)	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008)	
LC-MS (reductor/no reductor/alquilado)	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008) Goetze et al., Glycobiol., 21: 949-959 (2011)	
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Yan et al., J. Chrom. A., 1164: 153-161 (2007) Chelius et al., Anal. Chem., 78: 2370-2376 (2006) Miller et al., J. Pharm. Sci., 100: 2543-2550 (2011)	Pirogli N-terminal
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Yan et al., J. Chrom. A., 1164: 153-161 (2007); Xie et al., MAbs, 2: 379-394 (2010)	Oxidación de metionina
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Miller et al., J. Pharm. Sci., 100: 2543-2550 (2011)	Glicación específica de sitio
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Wang et al., Anal. Chem., 83: 3133-3140 (2011); Chumsae et al., Anal. Chem., 81: 6449-6457 (2009)	Cisteína libre
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) (incluyendo, por ejemplo, detección, identificación y caracterización de glicanos; glicación específica del sitio; detección de glicofoma, porcentaje de glicosilación; y/o aglicosilo)
LC-MS (reductor/no reductor/alquilado) * * Los procedimientos incluyen la eliminación (por ejemplo, enzimática, química y física) de glicanos	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008) Goetze et al., Glycobiol., 21: 949-959 (2011) Xie et al., mAbs, 2: 379-394 (2010)	Glicano (por ejemplo, glicano unido a N, glicano unido a N expuesto) (incluyendo, por ejemplo, detección, identificación y caracterización de glicanos; glicación específica del sitio; detección de glicofoma, porcentaje de glicosilación; y/o aglicosilo)
Bioanalizador (reductor/no reductor)	Forrer et al., Anal. Biochem., 334: 81-88 (2004)	Cadena pesada: Cadena ligera
LC-MS de péptido (reductor/no reductor)	Yan et al., J. Chrom. A., 1164: 153-161 (2007) Chelius et al., Anal. Chem., 78: 2370-2376 (2006) Miller et al., J. Pharm. Sci., 100: 2543-2550 (2011)	Modificaciones peptídicas no relacionadas con la glicosilación (incluyendo, por ejemplo, análisis de secuencia e identificación de variantes de secuencia; oxidación; succinimida; ácido aspártico; y/o ácido aspártico específico del sitio)
Cromatografía de intercambio de cationes débiles (WCX)	Dick et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 (2008)	Isoformas (incluidas, por ejemplo, variantes de carga (variantes ácidas y variantes básicas); y/o variantes desamidadas)
Cromatografía de intercambio aniónico	Ahn et al., J. Chrom. B, 878: 403-408 (2010)	Glicano sialilado
Cromatografía de intercambio aniónico	Ahn et al., J. Chrom. B, 878: 403-408 (2010)	Glicano sulfatado
Procedimiento de marcaje con 1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno (DMB)	Hoke et al., FEBS Lett., 275: 9-14 (1990)	Ácido siálico

LC-MS	Johnson et al., Anal. Biochem., 360: 75-83 (2007)	Amidación C-terminal
LC-MS	Johnson et al., Anal. Biochem., 360: 75-83 (2007)	Fragmentación N-terminal
Espectroscopía de dicroísmo circular	Harn et al., Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, SJ Shire et al., Eds, 229-246 (2010)	Estructura secundaria (incluyendo, por ejemplo, contenido de hélice alfa y/o contenido de lámina beta)
Fluorescencia intrínseca y/o con colorante ANS	Harn et al., Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, SJ Shire et al., eds, 229-246 (2010)	Estructura terciaria (incluyendo, por ejemplo, extensión del plegamiento de proteínas)
Intercambio de hidrógeno-deuterio-MS	Houde et al., Anal. Chem., 81: 2644-2651 (2009)	Estructura terciaria y dinámica (incluyendo, por ejemplo, accesibilidad de protones de amida al agua disolvente)
Cromatografía de exclusión por tamaño Ultracentrifugación analítica	Carpenter et al., J. Pharm. Sci., 99: 2200-2208 (2010) Pekar y Sukumar, Anal. Biochem., 367: 225-237 (2007)	Grado de agregación

Propiedades de la glicoproteína

5 **[0126]** Los patrones de sialilación de glicoproteínas pueden afectar a sus propiedades anti-inflamatorias. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento son útiles para producir glicoproteínas con niveles particulares de propiedades antiinflamatorias. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento se usan para producir glicoproteínas que contienen región Fc que contienen ácido siálico en brazos α 1,3 de glicanos ramificados con enlaces terminales NeuAc- α 2,6-Gal y que exhiben una actividad antiinflamatoria aumentada en relación con una glicoproteína de referencia, por ejemplo, un nivel de actividad antiinflamatoria que es 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%, al menos 100%, al menos 125%, al menos 150%, al menos 175%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300% o más, en relación con una glicoproteína de referencia.

15 **[0127]** En algunas partes de la descripción, los procedimientos descritos en el presente documento se usan para producir glicoproteínas que contienen la región Fc que tienen ácidos siálicos en brazos α 1,6 o en brazos α 1,3 y α 1,6 de glicanos ramificados que tienen las mismas propiedades o actividades biológicas o alternativas en diferentes estados de patológicos.

20 Composiciones Farmacéuticas y Administración

25 **[0128]** Una glicoproteína de la presente descripción (por ejemplo, una glicoproteína que contiene región Fc que comprende glicanos ramificados que están sialilados en un brazo α 1,3, un brazo α 1,6, o ambos, de los glicanos ramificados en la región Fc, por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal), se puede incorporar en una composición farmacéutica. En algunas partes de la descripción, dicha composición farmacéutica es útil como una composición mejorada para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la glicoproteína de referencia correspondiente. Las composiciones farmacéuticas que comprenden una glicoproteína pueden formularse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La composición farmacéutica puede administrarse 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 sialilada 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 principio activo incluido en las preparaciones farmacéuticas es tal que se proporciona una dosis adecuada dentro del intervalo designado.

35 **[0129]** La composición estéril para inyección puede ser formulada de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales utilizando agua destilada para inyección como vehículo. Por ejemplo, se pueden usar solución salina fisiológica o una solución isotónica que contiene glucosa y otros suplementos, tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio, como una 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 TM, HCO-50 y similares.

5 [0130] Los ejemplos no limitantes de líquido oleoso 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, tal como un tampón fosfato o un tampón de acetato de sodio, un agente calmante, tal como el clorhidrato de procaína, un estabilizador, tal como alcohol bencílico o fenol y un antioxidante. La inyección formulada puede envasarse en una ampolla adecuada.

10 [0131] En algunos casos, el nivel de glicanos sialilados (por ejemplo, glicanos ramificados que están sialilados en un brazo α 1,3, un brazo α 1,6, o ambos, del glicano ramificado en la región Fc, por ejemplo, con un enlace terminal NeuAc- α 2,6-Gal) en una preparación de anticuerpos o polipéptidos que contienen Fc, producidos usando un procedimiento descrito en el presente documento, se puede comparar con un nivel predeterminado u objetivo (por ejemplo, un nivel en un estándar de referencia o especificación farmacéutica), 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, transportar, traslada a una ubicación diferente, formular, etiquetar, envasar, liberar en el comercio, o vender u ofrecer a la venta el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo recombinante. En otros casos, la decisión puede ser aceptar, modificar o rechazar un parámetro o parámetros de producción utilizados para fabricar el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo. Los ejemplos particulares y no limitativos de estándares de referencia incluyen un nivel de control (por ejemplo, un polipéptido producido por un procedimiento diferente) o un intervalo o valor en una especificación de producto (por ejemplo, un master batch record, una especificación de liberación, una etiqueta de la FDA o una información del médico) o criterio de calidad o identidad para una preparación farmacéutica que contiene la preparación de polipéptidos.

25 [0132] En algunos casos, los procedimientos (es decir, los procedimientos de evaluación, identificación y producción) incluyen tomar medidas (por ejemplo, acciones físicas) en respuesta a los procedimientos descritos en este documento. Por ejemplo, una preparación de polipéptidos se clasifica, selecciona, acepta o descarta, libera o retiene, procesa en un producto farmacéutico, transporta, traslada a una ubicación diferente, formula, etiqueta, envasa, libera en el comercio, o vende u ofrece para la venta, dependiendo de si se cumple el valor preseleccionado o objetivo. En algunos casos, el procesamiento puede incluir la formulación (por ejemplo, la combinación con excipientes farmacéuticos), el envasado (por ejemplo, en una jeringa o vial), el etiquetado o transporte de al menos una parte de la preparación de polipéptidos. En algunos casos, el procesamiento incluye la formulación (por ejemplo, la combinación con excipientes farmacéuticos), el envasado (por ejemplo, en una jeringa o vial) y el etiquetado de al menos una parte de la preparación como un medicamento descrito en este documento. El procesamiento puede incluir dirigir y/o contratar a otra parte para procesar, tal como se describe en este documento.

35 [0133] 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 puede analizarse mediante cualquier procedimiento conocido. En algunas realizaciones, se evalúa la actividad de unión de un polipéptido (por ejemplo, unión a un receptor). En algunas realizaciones, se evalúa la actividad terapéutica de un polipéptido (por ejemplo, una actividad de un polipéptido en la disminución de la gravedad o síntoma de una enfermedad o afección, o en el retraso de la aparición de un síntoma de una enfermedad o afección). En algunas realizaciones, se evalúa la actividad farmacológica de un polipéptido (por ejemplo, biodisponibilidad, farmacocinética, farmacodinámica). Para procedimientos de análisis de biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinámica de los agentes terapéuticos con glicoproteína, véase, por ejemplo, Weiner et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (5): 571-9, 1997; Srinivas et al., J. Pharm. Sci. 85 (1): 1-4, 1996; y Srinivas et al., Pharm. Res. 14 (7): 911-6, 1997.

45 [0134] La actividad biológica o la actividad terapéutica particulares que se pueden ensayar variará dependiendo del polipéptido particular (por ejemplo, anticuerpo). La posible actividad adversa o toxicidad (por ejemplo, propensión a causar hipertensión, reacciones alérgicas, eventos trombóticos, convulsiones u otros eventos adversos) de las preparaciones de polipéptidos se puede analizar mediante cualquier procedimiento disponible. En algunas realizaciones, se evalúa la inmunogenicidad de una preparación de polipéptidos, por ejemplo, determinando si la preparación provoca una respuesta de anticuerpos en un sujeto.

50 [0135] La ruta de administración puede ser parenteral, por ejemplo, administración por inyección, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transcutánea. La administración puede ser sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea.

55 [0136] Se puede seleccionar un medio de administración adecuado en función de la edad y el estado del paciente. Se puede seleccionar una dosis única de la composición farmacéutica que contiene una glicoproteína modificada de un intervalo 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 descripción no se limita a dichos intervalos. La dosis y el procedimiento de administración varían según el peso, la edad, el estado y similares del paciente, y los expertos en la técnica pueden seleccionarlos adecuadamente, según sea necesario.

60 [0137] Los materiales, procedimientos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo

significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta descripción. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente descripción, en el presente documento se describen procedimientos y materiales adecuados.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Galactosilación y sialilación de IVIG

10 **[0138]** Se analizó la sialilación de IVIG por la sialiltransferasa ST6. IVIG fue primero galactosilado y a continuación sialilado. Las reacciones se realizaron secuencialmente. No hubo purificación entre las reacciones de galactosilación y sialilación. La abundancia relativa de glicofomas se analizó después de las reacciones de sialilación.

A. Galactosilación

15

[0139] Se preparó una reacción que contenía los siguientes componentes a las concentraciones indicadas:

Constituyente	Concentración final
MOPS (pH 7,4)	25 mM
MnCl ₂	10 mM
IVIG	12,5 mg/ml
B4GalT1 (90 u/ml)	400 mu/ml
UDP-Galactosa	50 mM

20 **[0140]** La reacción se incubó durante 72 horas a 37 °C.

20

B. Sialilación

[0141] A una alícuota de la reacción de galactosilación se añadieron CMP-NANA, tampón MOPS y ST6Gal1. El volumen final se ajustó para que la concentración final de componentes en la reacción fuera la indicada.

25

Constituyente	Concentración final
MOPS (pH 7,4)	50 mM
MnCl ₂	8 mM
IVIG	10 mg/ml
CMP-NANA	20 mu/ml
ST6Gal1 (SEQ ID NO: 1)	0,6 mg ST6/mg IVIG

[0142] La reacción se incubó a 37 °C. Se extrajeron alícuotas en los tiempos indicados en la Figura 2 y se congelaron a -20 °C para análisis posteriores.

C. Resultados

30

[0143] Tal como se muestra en la Figura 3, la glicofoma predominante cambió con el tiempo de G2F a A1F (1,3) a A2F a A1F (1,6). Los resultados se resumen en el esquema de reacción representado en la Figura 4. Tal como se muestra en la Figura 4, el producto glicoforme puede cambiar entre G2F, A1F (1,3), A2F y A1F (1,6) durante el transcurso de una reacción debida a las etapas competitivas de adición (reacción hacia adelante) y eliminación (reacción hacia atrás).

35

[0144] La Sialiltransferasa ST6 puede añadir ácido siálico a cualquiera de las ramificaciones de un N-glicano biantenarico de un sustrato. Sin embargo, estos resultados demuestran que la adición a cada ramificación tiene lugar a diferentes velocidades, lo que resulta en diferentes productos finales dependiendo de las condiciones de reacción. La adición de ácido siálico a la ramificación α 1,3 es mucho más rápida que la adición a la ramificación α 1,6.

40

[0145] Estos datos también demuestran que la sialiltransferasa ST6 también puede catalizar la eliminación de ácidos siálicos de los N-glicanos. La eliminación de ácido siálico de la ramificación α 1,3 es mucho más rápida que la eliminación de la ramificación α 1,6. Esto puede conducir sorprendentemente a la producción de glicanos Fc monosialilados sustancial o principalmente en la ramificación α 1,6 modulando las condiciones de reacción.

45

[0146] Este ejemplo demuestra que las condiciones de reacción pueden controlarse para producir un producto de glicoproteína que tiene un nivel de sialilación predeterminado u objetivo. Dichas condiciones pueden incluir tiempo, concentración de sialiltransferasa ST6, concentración de sustrato, concentración de nucleótido de azúcar donante, concentración de nucleótido del producto, pH, composición de tampón y/o temperatura.

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, en el que la preparación es una preparación de IVIG que comprende un nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos el 60% de los glicanos ramificados sialilados, comprendiendo el procedimiento :
- 5 proporcionar una preparación de IVIG, en el que la preparación de IVIG comprende una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; y
- 10 poner en contacto la preparación de IVIG con una sialiltransferasa ST6 y un donante de ácido siálico en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 y a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, y no sean suficientes para que la sialiltransferasa ST6 elimine sustancialmente un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado, en el que la sialiltransferasa ST6 es un polipéptido involucrado en la transferencia de un ácido siálico a una galactosa terminal de un glicano a través de un enlace α 2,6, y en el que las condiciones de reacción comprenden suplementar el donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción;
- 15 produciendo así una preparación de IVIG que tiene el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en el brazo α 1,3 y en el brazo α 1,6.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además aislar la preparación de glicoproteínas y opcionalmente comprende además medir un nivel de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos ramificados sialilados en la preparación de IVIG.
- 30 4. Procedimiento, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de glicanos ramificados sialilados en la preparación de IVIG.
- 35 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las condiciones de reacción comprenden controlar la cinética de reacción de manera que: (i) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 excede la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3; y (ii) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 excede la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6.
- 40 6. Procedimiento para modular la sialilación de glicanos ramificados con región Fc que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6 en una preparación de IVIG, comprendiendo el procedimiento:
- 45 proporcionar una solución de reacción que comprende (i) una preparación de IVIG que comprende glicanos ramificados con región Fc que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, (ii) una sialiltransferasa ST6, y (iii) un donante de ácido siálico; e
- 50 incubar la solución de reacción en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa ST6 catalice la transferencia de un ácido siálico tanto al brazo α 1,3 como al brazo α 1,6, en el que dicha etapa de incubación comprende controlar la cinética de reacción de manera que: (i) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 ($R_a^{1,3}$) exceda la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 ($R_r^{1,3}$); y (ii) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 ($R_a^{1,6}$) exceda la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 ($R_r^{1,6}$), en el que la sialiltransferasa ST6 es un polipéptido involucrado en la transferencia de un ácido siálico a una galactosa terminal de un glicano a través de un enlace α 2,6, y en el que las condiciones de reacción comprenden suplementar el donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción; modulando así la sialilación de un glicano ramificado.
- 55 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que:
- (i) controlar la cinética de la reacción comprende modular el tiempo de la reacción;
- (ii) controlar la cinética de la reacción comprende modular el nivel o la actividad de la sialiltransferasa;
- (iii) el procedimiento comprende detectar la cinética de reacción;
- (iv) el procedimiento comprende medir un nivel de glicanos sialilados;
- (v) controlar la cinética de la reacción comprende modular la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3 ($R_r^{1,3}$) o la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6 ($R_r^{1,6}$) controlando o ajustando la relación del donante de ácido siálico con respecto a un producto de reacción del donante de ácido siálico;
- (vi) el donante de ácido siálico es ácido citidina 5'-monofosfo-N-acetil neuramínico y el producto de reacción del donante de ácido siálico es citidina 5'-monofosfato;
- (vii) las condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos α 1,3 y α 1,6 comprenden eliminar un producto de reacción del donante siálico al menos una vez durante la

reacción; o

(viii) las condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa catalice la transferencia del ácido siálico a los brazos α 1,3 y α 1,6 comprende suplementar el producto de reacción del donante siálico al menos una vez durante la reacción.

5 8. Procedimiento para producir un producto farmacéutico que comprende una preparación de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6, en el que la preparación es una preparación de IVIG que comprende un nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos el 60% de los glicanos ramificados sialilados, comprendiendo el procedimiento:

10 proporcionar una preparación de IVIG, en el que la preparación de IVIG comprende una pluralidad de glicoproteínas que comprenden regiones Fc que comprenden glicanos ramificados que comprenden un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6; poner en contacto la preparación de IVIG con una sialiltransferasa ST6 y un donante de ácido siálico en condiciones de reacción suficientes para que la sialiltransferasa ST6 añada sustancialmente un ácido siálico a un brazo α 1,3 y a un brazo α 1,6 de un glicano ramificado, y no sean suficientes para que la sialiltransferasa ST6 elimine sustancialmente un ácido siálico de un brazo α 1,3 de un glicano ramificado, produciendo así una preparación de glicoproteínas sialiladas, en el que la sialiltransferasa ST6 es un polipéptido involucrado en la transferencia de un ácido siálico a una galactosa terminal de un glicano a través de un enlace α 2,6, y en el que las condiciones de reacción comprenden suplementar el donante de ácido siálico al menos una vez durante la reacción; y formular la preparación en un producto farmacéutico si la preparación cumple con el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6.

15 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende además medir el nivel de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 en la preparación.

20 10. Procedimiento, según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que las condiciones de reacción comprenden controlar la cinética de reacción de manera que: (i) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,3 excede la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,3; y (ii) la velocidad de adición de un ácido siálico a un brazo α 1,6 excede la velocidad de eliminación de un ácido siálico de un brazo α 1,6.

25 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos un 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o 100% de glicanos ramificados sialilados en la preparación de IVIG.

30 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el nivel objetivo de glicanos ramificados disialilados que tienen un ácido siálico en un brazo α 1,3 y en un brazo α 1,6 es al menos un 75%, 80%, 85%, 90 %, 95% o 100% de glicanos ramificados sialilados en la preparación de IVIG.

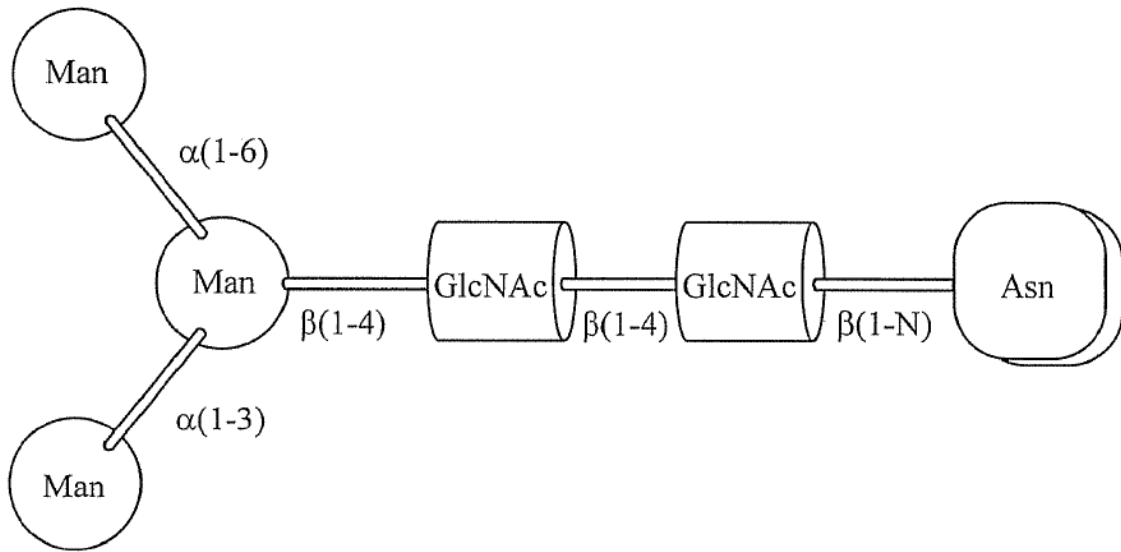


FIG. 1

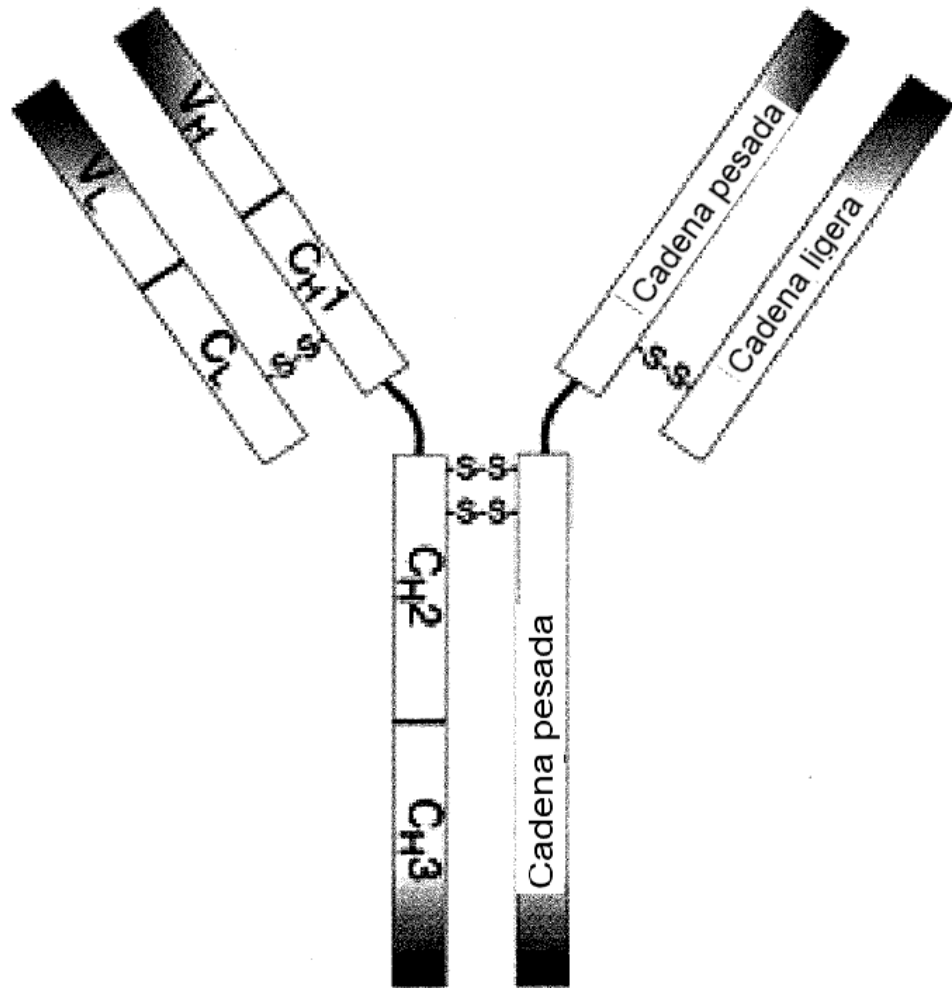


FIG. 2

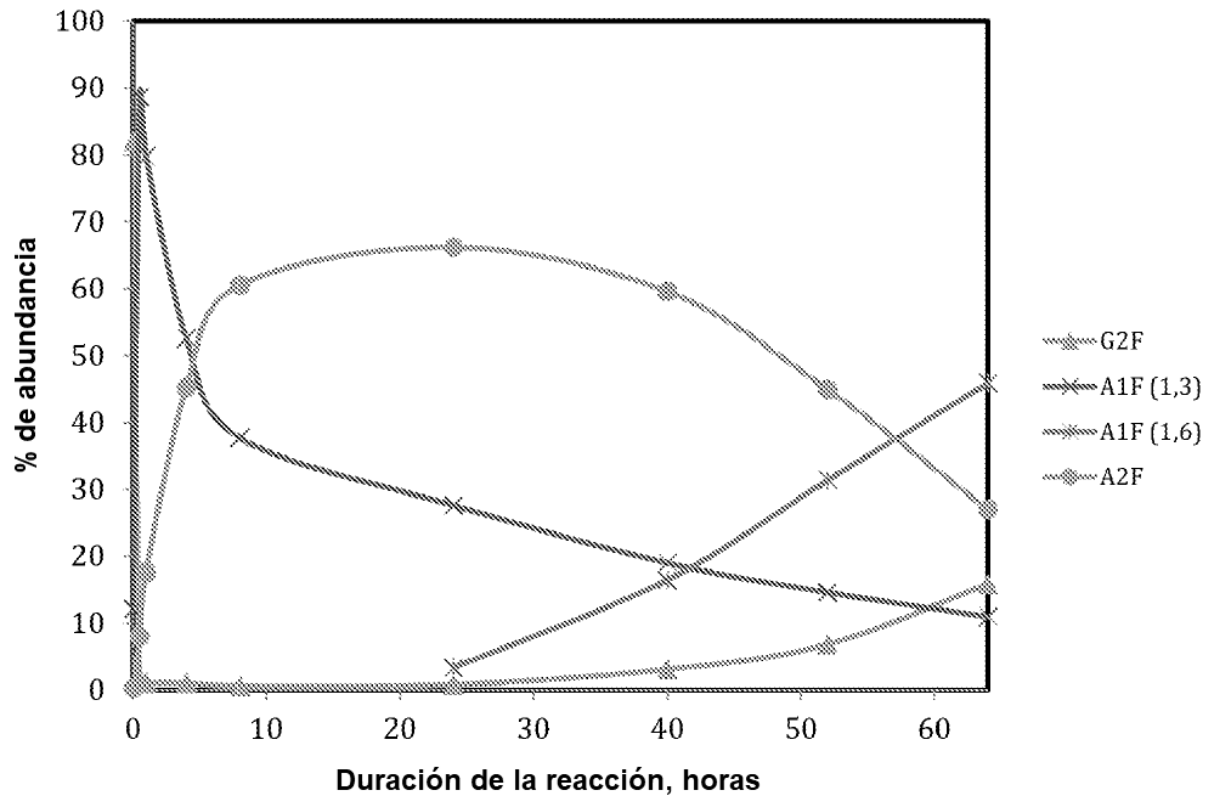


FIG. 3

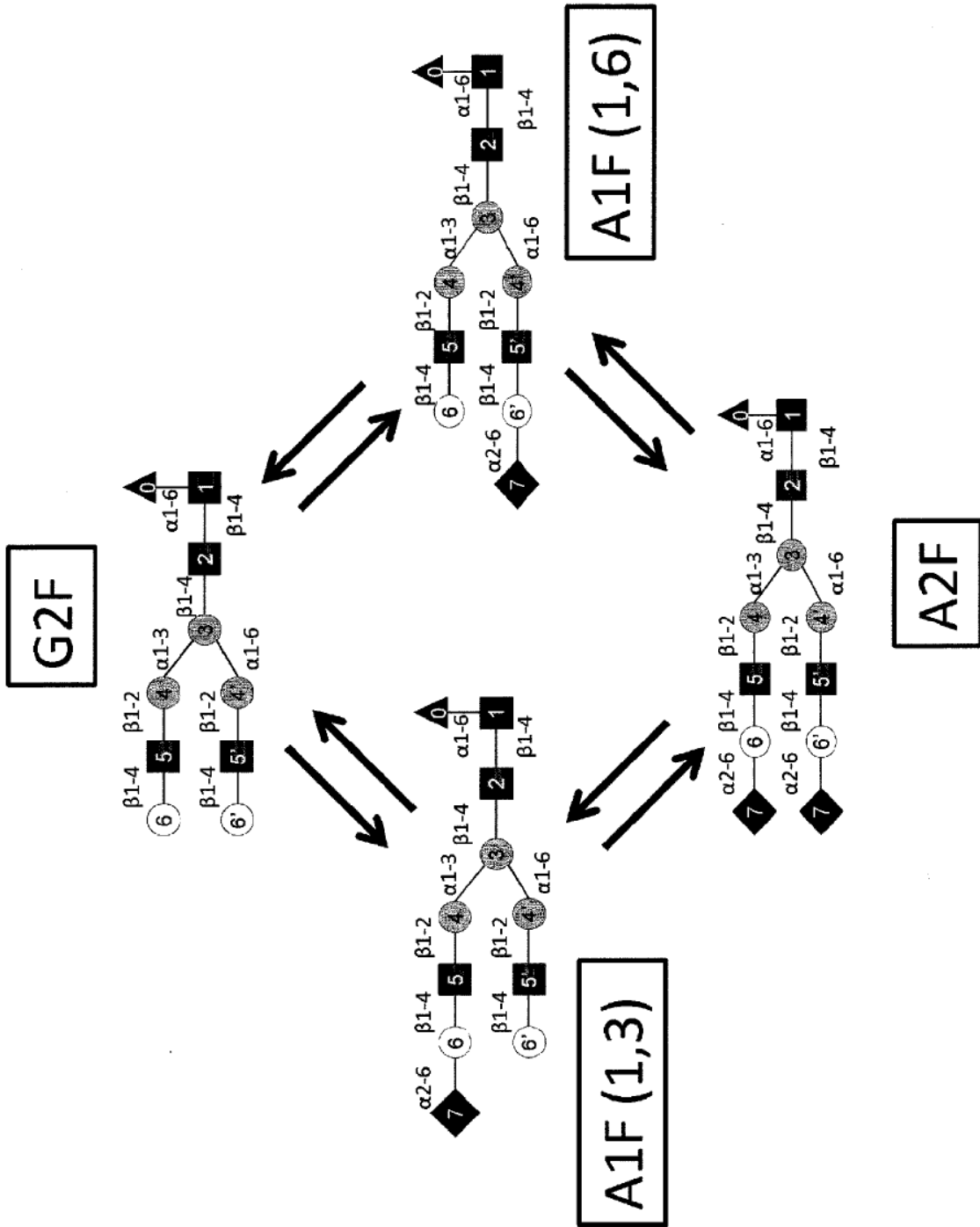


FIG. 4

SEQ ID NO:1

MTRLTVLALLAGLLASSRAGSSPLLAMEWSHPQFEKLEGGGSGGGSGGSWSHPQFEKHAHAHSR
KDHLIHNVHKEEHAHAHNKELGTAVFQGPMMRAIRGRSFQVWNKDSSSKNLIPRLQKIWKNYLS
MNKYKVSYKGP GPGIKFSAEALRCHLRDHNVMVEVTDFFPNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWG
RCAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQQDVGTKTTIRLMNSQLVTTEKRFLKD
SLYNEGILIVWDPSVYHSDIPKWYQNP DYNFFNNYKTYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQE
ISPEEIQPNPPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEF LPSKRKTDVCYYYQKFFDSACTMGAYHPLLY
EKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC PG

FIG. 5A

SEQ ID NO:2

GSYYDSFKLQTKFQVLKSLGK LAMGSDSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAKPEASFQV
WNKDSSSKNLIPRLQKIWKNYLSMNKYKVSYKGP GPGIKFSAEALRCHLRDHNVMVEVTDFFP
FNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQQD
VGTTKTTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSLYNEGILIVWDPSVYHSDIPKWYQNP DYNFFNNYKTYRKL
HPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEIQPNPPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEF LPSKRKTD
VCYYYQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC

FIG. 5B

SEQ ID NO:3

MIHTNLKKKFSYFILAFLLFALICVWKKGSYEALKLQAKEFQVTKSLEKLAIGSGSQSTSASIK
QDSKPGSQVLSHLRVTAKVKPQSPYQVWDKNSSSKNLNPR LQKILKNYLSMNKYKVSYKGP GPG
VKFSVEALRCHLRDRVNVSMIEATDFFPNTTEWEGYLPKENFR TKAGPWHRCAVVSSAGSLKSS
HLGKEIDSHDAVLRFN GAPVADFQQDVG MTKTTIRLMNSQLITTEKQFLKDSLYNEGILIVWDPS
LYHADIPNWKPKPDYNFFETYKSYRKL YPSQPFYILRPQMPWELWDI IQEIAPDRIQPNPPSSG
MLGIIIMMTLCDQVDVYEF LPSKRKTDVCYYH QKFFDSACTMGAYHPLLFEKNMVKQLNEG TDE
DIYIFGKATLSGFRTIHC

FIG. 5C