(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 533 964**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2007 PCT/EP2007/007877**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2008 WO08028686**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 07818090 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **18.10.2023 EP 2073842**

(54) Título: **Uso de células humanas de origen leucémico mieloide para expresión de anticuerpos**

(30) Prioridad:

10.09.2006 EP 06090162
18.09.2006 EP 06090171
13.10.2006 EP 06090190
04.05.2007 EP 07090094

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
09.05.2024

(73) Titular/es:

GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

GOLETZ, STEFFEN;
DANIELCZYK, ANTJE;
BAUMEISTER, HANS;
STAHN, RENATE;
LÖFFLER, ANJA y
STÖCKL, LARS

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 533 964 T5

DESCRIPCIÓN

Uso de células humanas de origen leucémico mieloide para expresión de anticuerpos

Compendio

La invención proporciona métodos biotecnológicamente favorables para la producción de composiciones moleculares de proteínas y en particular composiciones moleculares de anticuerpos que tienen actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y una glicosilación humana. Proporciona además nuevas células huésped y composiciones moleculares de anticuerpos.

Introducción

Un rasgo y desafío clave para la industria es la producción de proteínas recombinantes, y la productividad, coste, homogeneidad y actividad de proteína son elementos clave que quedan por optimizar. La glicosilación es también un elemento clave en la producción de altos rendimientos de glicoproteínas recombinantes homogéneas que plantea una serie de problemas críticos para su producción. Cada línea celular de producción actual ofrece una serie de diferentes desafíos y problemas que son debidos en gran medida a la complejidad y la especie, tejido y especificidad al sitio de la glicosilación. Por lo tanto, la optimización de los sistemas de producción con respecto a la glicosilación sigue siendo uno de los aspectos claves para optimización. Esta particularmente, ya que las diferencias en el patrón de glicosilación tienen a menudo un impacto considerable en la actividad, inmunogenicidad, biodisponibilidad y semivida de las moléculas de proteína. Se da una visión de conjunto detallada de propiedades de la glicosilación de diferentes líneas celulares derivadas de diferentes especies y sistemas de producción no mamíferos en Jenkins et al (Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry, Nat Biotechnology, 1996, 14: 975-981).

Los anticuerpos son grandes herramientas para diagnosis e investigación, y probablemente llegarán a ser la familia más grande de terapéuticos. Están en el mercado más de diez terapéuticos de anticuerpos recombinantes, y cientos en desarrollo clínico. Un rasgo y desafío clave para la industria es la producción de anticuerpos recombinantes ("rMAbs"), y la productividad, coste, homogeneidad y actividad de anticuerpo son elementos clave que quedan por optimizar. Casi todos los rMAbs terapéuticos en el mercado han sido producidos en las líneas celulares de roedores a partir de hámster (CHO) y ratones (NS0 o Sp2/0). La gran mayoría de los rMAbs en desarrollo son producidos en células de roedores, y otros están en desarrollo, sin embargo, ninguno ha sido suficiente para optimizar la productividad, coste, homogeneidad y actividad de anticuerpo.

La glicosilación es también un elemento clave en la producción de altos rendimientos de rMAbs homogéneos y potentes que plantea una serie de problemas críticos para la producción de rMAbs. Cada línea celular de producción actual ofrece una serie de diferentes desafíos y problemas que son debidos en gran medida a la complejidad y la especie, tejido y especificidad al sitio de la glicosilación [Revisión: Royston Jefferis, CCE IX: Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics; Biotechnol. Prog. 2005, 21, 11-16].

Por lo tanto, la optimización de sistemas de producción de proteínas y en particular de anticuerpos con respecto a la glicosilación sigue siendo uno de los aspectos clave para la optimización.

La presente invención proporciona nuevos sistemas de expresión basados en células sanguíneas humanas inmortalizadas, y en particular basados en células de origen leucémico mieloide. Estas células mejoran sorprendentemente la producción de proteínas glicosiladas y en particular anticuerpos con respecto a actividad, rendimiento y/o homogeneidad.

Antecedentes de la técnica

Las proteínas son un grupo diverso cuya función y aparición varía ampliamente de unas a otras. Entre las proteínas de potencial terapéutico, la mayoría de las proteínas están glicosiladas, tal como muchas hormonas (p.ej. hormona del crecimiento, glucagón, FSH y LH), factores de crecimiento (p.ej. GM-CSF, G-CSF, VEGF y eritropoyetina), citocinas (p.ej. IL-2, IL-7, interferón-alfa y -beta, TNF-alfa), anticoagulantes (p.ej. lepirudina, desirudina), factores de coagulación sanguínea (p.ej. factores VII, VIII y IX), vacunas (p.ej. antígeno de hepatitis B) y anticuerpos. Los sistemas celulares de producción establecidos son incapaces de producir proteínas con la glicosilación humana original. Los sistemas celulares procarióticos (p.ej. bacterias) y la mayoría de eucarióticos (p.ej. célula de levadura, insecto y planta) sintetizan proteínas que carecen de glicosilación o llevan glicanos que difieren en gran medida de las cadenas de carbohidrato humanas. Las células de ovario de hámster chino (CHO) son un sistema de producción usado comúnmente que es capaz de glicosilar proteínas de una manera similar a las células humanas. Sin embargo, sigue habiendo importantes diferencias, tales como en galactosilación, fucosilación, glicosilación particular con N-acetilglucosaminas, y especialmente en diversos aspectos de sialilación. Estas diferencias influyen en la actividad, la biodisponibilidad, la inmunogenicidad y la semivida.

En el momento en que se establecieron estos sistemas de producción, era suficiente producir proteínas terapéuticas que fueran al menos hasta cierto punto activas. Sin embargo, hoy se concentran grandes esfuerzos para mejorar la actividad de una proteína terapéutica con el objetivo de (I) reducir el número y concentración de las dosis aplicadas de las proteínas terapéuticas, (II) reducir los costes de una terapia, y (III) reducir los efectos secundarios.

La principal estrategia para mejorar la bioactividad de las proteínas es alargar su semivida en suero y por tanto su biodisponibilidad. Esto se puede hacer p.ej. mediante el procedimiento llamado PEGilación, donde ciertas formas de polietilenglicol son añadidas/enlazadas químicamente a la proteína producida. El PEG aumenta el peso molecular y por tanto la semivida en suero. Sin embargo, están asociados varios problemas con este procedimiento. Por ejemplo, en casi todos los casos la PEGilación disminuye la actividad de una proteína por su función efectora celular, la administración repetitiva en seres humanos da como resultado a menudo una respuesta inmune adversa como anticuerpos neutralizantes, y/o el procedimiento de producción necesita modificación química adicional dando como resultado un proceso multietapas con costes adicionales, pérdidas y tiempo. Existen sistemas portadores similares (p.ej. HESilación o unión de albúmina) que tienen inconvenientes comparables.

También, la modificación de las cadenas de carbohidrato y por tanto la glicosilación de proteínas es el centro de atención para mejorar la semivida en suero de proteínas expresadas de manera recombinante. Las tecnologías se centran de este modo en la maximización del grado de sialilación de una glicoproteína recombinante. Los ácidos siálicos son los monosacáridos terminales más predominantes en la superficie de las células eucarióticas, y se cree generalmente que cuanto más esté sialilada una glicoproteína más larga es su semivida en suero durante la circulación. Esto se basa en la presencia de ciertos receptores como el asialoproteína-receptor en el hígado, que se une a proteínas no sialiladas circulantes y las dirige hacia la célula para degradación.

Están presentes diversas clases de anticuerpos en el ser humano y la mayoría de los mamíferos, a saber, IgG, IgM, IgE, IgA, IgD. Aunque se usan moléculas de todas las clases de anticuerpos en diagnosis o como herramientas de investigación, la mayoría de los terapéuticos basados en anticuerpos en el mercado y en desarrollo son IgG, y en menor medida IgM. La clase IgG humana se clasifica además en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La estructura básica de una molécula de IgG consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden dos regiones Fab, cada una con un dominio variable que comprende el sitio de unión a antígenos y un dominio constante, una región Fc que comprende más dominios constantes y los sitios de interacción para ligandos, y la región bisagra flexible que conecta las regiones Fab y Fc. Los anticuerpos pueden existir como moléculas enteras o como fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab o Fv de cadena única que comprenden las dos regiones variables de la cadena pesada y ligera conectadas por medio de un enlazador. La Fig. 18 muestra un anticuerpo IgG.

Los anticuerpos recombinantes para uso terapéutico son muy a menudo quiméricos, humanizados o las llamadas secuencias de proteína totalmente humanas, a fin de reducir su inmunogenicidad. Sin embargo, no se han conseguido fácilmente moléculas en realidad totalmente humanas dado que las modificaciones post-translacionales tales como particularmente la glicosilación no son humanas debido a la producción en células de roedores o CHO, y por tanto pueden diferir de las modificaciones encontradas en anticuerpos humanos en sueros humanos. Las diferencias en la modificación, en particular el patrón de glicosilación, pueden tener un serio impacto en la actividad y la inmunogenicidad del anticuerpo producido respectivamente.

La actividad de un anticuerpo puede ser debida a e influenciada por una combinación de efectos. Por una parte el anticuerpo tiene una cierta especificidad que es mediada por la región variable del anticuerpo ("región V") ubicada en la región Fab de ciertas secuencias, las regiones CDR, de la región V. Juegan un papel clave en determinar la especificidad y afinidad particulares de un anticuerpo. Las regiones V son por tanto decisivas para las características de unión al epítopo, y varían de anticuerpo a anticuerpo. La afinidad de un anticuerpo describe la fuerza y cinética de la unión de una única región de unión de un anticuerpo a su epítopo. Dado que las diversas clases y subclases de anticuerpos llevan entre dos y diez regiones variables idénticas en una molécula de anticuerpo, la fuerza y cinética de la unión de un anticuerpo es influenciada por el número de sitios de unión disponibles para unir y la accesibilidad de los epítopos en el antígeno o célula diana, y es expresada en su avidez.

Otro factor importante para la calidad de un anticuerpo para su uso en diagnosis y especialmente en terapia es el número de sitios de unión de un anticuerpo en su estructura o célula diana, así como su velocidad de internalización. Estas calidades influyen en los efectos e idoneidad de un anticuerpo para su uso, especialmente en terapia.

Por otra parte, los mecanismos efectores relevantes para uso terapéutico de un anticuerpo son varios múltiplos, por lo que algunos de los anticuerpos actúan por medio de sólo un mecanismo y otros por una combinación de varios mecanismos efectores. Una estrategia es acoplar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a moléculas efectoras que median en un efecto terapéutico, tal como acoplamiento a una molécula efectora inmune, por ejemplo interleucina 2 para reclutar el sistema inmune, o acoplamiento a toxinas o radioisótopos a fin de matar células diana, por ejemplo para terapias antitumorales. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados son también valiosos para diagnosis in vivo.

La otra estrategia es usar anticuerpos no marcados, los llamados "desnudos", que pueden tener importantes ventajas tales como menor toxicología, logística menos complicada, el uso de armas efectoras inmunes naturales o el desencadenamiento de efectos terapéuticos sin necesidad de moléculas efectoras adicionales. Se han realizado un gran número de estudios para dilucidar los mecanismos de actividad y modo de acción de anticuerpos, así como desarrollar anticuerpos usando estas actividades. Entre las actividades y efectos más importantes están la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (denominada en la presente memoria "actividad ADCC"), la actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (denominada en la presente memoria "actividad CDC"), la actividad de citotoxicidad mediada por fagocitosis (denominada en la presente memoria "actividad de

fagocitosis"), actividad mediada por un receptor (denominada en la presente memoria "actividad mediada por receptor"), que comprende un conjunto entero de diferentes efectos y actividades.

Las actividades mediadas por receptor están basadas principalmente en la unión del anticuerpo a una molécula o receptor en una célula diana o por el impedimento de la unión de ciertas moléculas a una célula diana, induciendo o inhibiendo de este modo ciertos efectos sobre estas células, tales como actividad antagonística o agonística o bloqueo de receptor de un anticuerpo, conduciendo por ejemplo a la inducción o inhibición de apóptosis o proliferación de células diana o a la secreción o inhibición de la secreción de ciertas moléculas en una célula diana, o bloqueo o desencadenamiento de ciertos otros eventos mediados por receptor tales como interacciones entre moléculas y células o entre células. La actividad ADCC, actividad CDC y actividad de fagocitosis son actividades citotóxicas que son mediadas por la región Fc del anticuerpo (denominadas en la presente memoria "actividades mediadas por la parte Fc") mientras que las actividades, afinidad, avidez y especificidad mediadas por receptor del anticuerpo son mediadas principalmente por la región enlazante del anticuerpo comprendida en la región Fab.

Las actividades mediadas por la parte Fc son mediadas por medio de células efectoras inmunológicas tales como células asesinas, células asesinas naturales y macrófagos activados, o diversos componentes del complemento por unión a ligandos efectores tales como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRIII, componente Cq1 del complemento, el receptor Fc neonatal (FcRn), etc. Se reporta que la subclase IgG1 humana tiene la actividad ADCC y CDC más alta entre las moléculas de clase IgG humana. Para IgM la actividad CDC es un mecanismo efector dominante. La actividad ADCC y actividad CDC implican la unión de la región Fc, la región constante del anticuerpo, a receptores de Fc tales como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRIII de la célula efectora o componentes del complemento tales como C1q. Hay importantes residuos de aminoácidos en la región bisagra, y en particular en el segundo dominio de la región constante ("dominio Cgamma2"). Una cadena de carbohidrato que está unida a los dominios Cgamma2 es importante para la actividad. La cadena de carbohidrato está unida al aminoácido asparagina 297 (Asn-297) de Cgamma2 (cadenas de carbohidrato enlazadas por N-glicósido). El término de la cadena de carbohidrato que se une a la asparagina se llama extremo reductor, y el extremo opuesto se llama extremo no reductor. La región Fc de un anticuerpo IgG tiene dos sitios de unión con carbohidratos. La Fig. 18 muestra la estructura de una molécula de IgG e indica la posición donde se pueden encontrar típicamente estructuras de carbohidrato. Además, se explica la estructura química y composición de estas estructuras de carbohidrato.

De las actividades mediadas por la parte Fc, se supone que dos están influenciadas por la glicosilación del anticuerpo: se ha demostrado que la retirada de la cadena de azúcar en la parte Fc del anticuerpo da como resultado la desaparición de la actividad CDC y ADCC, y también una reducción de galactosas en estos N-glicanos causa una disminución en la actividad CDC [Boyd et al., Molecular Immunol., 32, 1311, (1995); documento de patente US 6,946,292]. Además, se describe que la expresión de anticuerpos en células de rata da como resultado una actividad ADCC aumentada de ciertos anticuerpos expresados en las mismas [Lifely et al., Glycobiology, 1995 Dec;5(8):813-22; solicitud de patente internacional WO00/61739] cuando se compara con el mismo anticuerpo expresado en células de hámster y de rata. Ambos informes suponen que los cambios en la glicosilación causan estas diferencias en la actividad ADCC del anticuerpo, sin embargo, esto no está claro. Lifely et al., 1995, supone que la N-acetilglucosamina bisectora ("bisecGlcNAc") es responsable de una actividad ADCC aumentada del anticuerpo, mientras que la solicitud de patente internacional WO00/61739 supone que una disminución drástica de fucosa enlazada en alfa 1-6 a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de N-glicanos ("fucosa núcleo") es responsable de una actividad ADCC aumentada. Además, se describe que la expresión recombinante de la enzima GnTIII en células CHO que es responsable de unir la bisecGlcNAc de azúcar a N-glicanos da como resultado un aumento de la actividad ADCC de ciertos anticuerpos cuando se expresan en estas células cuando se compara con el mismo anticuerpo expresado en células CHO no transfectadas de manera recombinante con GnTIII [documento de patente US 6,602,684, Umana et al., Nature Biotechn 17: 176-180 (1999)]. Adicionalmente, se describió que la inactivación del gen FUT8 en células CHO, que da como resultado la falta de fucosa núcleo, puede aumentar la actividad ADCC de ciertos anticuerpos cuando se expresa en tales células FUT8 KO CHO [documento de patente US 6,946,292]. Estos resultados también demuestran la importancia y complejidad del patrón de glicosilación para la actividad del anticuerpo.

Sin embargo, un patrón de glicosilación "extraño" y por tanto no optimizado puede no sólo ser perjudicial para la actividad, también puede ser inmunogénico. Los sistemas de expresión y producción actuales para proteínas y en particular anticuerpos son principalmente líneas celulares derivadas de roedores, y están basados en líneas celulares de hámster, ratones o rata tales como CHO, BHK, NS0, Sp2/0 e YB2/0. Se sabe que las células de roedor pueden producir bajo condiciones no óptimas varios productos proteicos anormalmente glicosilados que carecen de potencia o son inmunogénicos. Además, se sabe que las células de roedor expresan estructuras de carbohidrato con importantes diferencias a las expresadas en células humanas que comprenden la presencia de azúcares no humanos y la falta de ciertos restos de azúcar humanos que pueden hacer a proteínas expresadas en estas células por ejemplo inmunogénicas, menos eficaces, de menor rendimiento o requisitos estructurales subóptimos de plegado. La mayoría de células de roedor expresan por ejemplo ácido N-glicolilneuramínico ("NeuGc"), una alternativa para el ácido N-acetilneuramínico ("NeuNAc") no presente en seres humanos que es inmunogénico en seres humanos y/o la modificación de galactosa inmunogénica alfa(1-3) galactosa ("Gal alfa1-3Gal"), y/o carecen de importantes carbohidratos tales como el importante NeuNAc enlazado en 2-6, o carecen de bisecGlcNAc. Hay también otras diferencias conocidas y desconocidas. Además, de la producción de roedores se sabe que los perfiles de glicoforma son mayoritariamente heterogéneos, y también el perfil de glicoforma específico a clones, que puede

variar ampliamente de clon a clon en células CHO, NS0 o Sp2/0 y son dependientes del modo de producción y condiciones de cultivo.

Además, existen sistemas de producción para la producción de proteínas que incorporan células humanas, tales como p.ej. células Hek 293, que son derivadas de células de riñón embrionario humano, o el sistema celular PerC6®, que es derivado de una única célula humana derivada de la retina, que fue inmortalizada a propósito usando tecnología de ADN recombinante. Sin embargo, estas líneas celulares, si bien se prefieren a menudo sobre sistemas celulares no humanos, tienen aún algunos inconvenientes. Tienen un patrón de glicosilación único, que es atribuible a la maquinaria de glicosilación de las células respectivas. Sin embargo, dependiendo de la proteína a ser producida, podrían no entregar un perfil de glicosilación optimizado, p.ej. con respecto a la actividad y /o semivida en suero de la proteína. En particular es difícil conseguir un cierto grado y patrón de sialilación con estas células. P.ej. los sistemas celulares conocidos en el estado de la técnica a menudo no son capaces de proporcionar una sialilación enlazada en alfa 2,6 detectable, que, sin embargo, es importante para la semivida en suero.

A partir de estos hechos llega a estar claro que hay aún una necesidad de sistemas de expresión y producción que puedan optimizar adicionalmente la productividad, homogeneidad y/o actividad de anticuerpo proporcionando alternativas y/o sistemas de expresión mejorados. Además, a partir de estos hechos también llega a estar claro que no puede decirse qué estructuras de carbohidrato y especialmente qué estructuras de carbohidrato humanas son óptimas para mejorar la actividad u homogeneidad de proteínas y en particular anticuerpos, y qué tipo de patrón de glicosilación tiene que proporcionar una línea celular y especialmente una línea celular humana para optimizar la actividad de una proteína, en particular un anticuerpo. Por lo tanto, hay una necesidad de sistemas de expresión que proporcionen productos con un patrón de glicosilación divergente en comparación con los productos obtenidos con los sistemas de expresión conocidos en el estado de la técnica.

La presente invención proporciona soluciones a estos problemas proporcionando nuevos sistemas de expresión basados en líneas celulares sanguíneas inmortales humanas, y en particular células de origen leucémico mieloide. Usar células sanguíneas humanas inmortalizadas es ventajoso en comparación con los sistemas conocidos en la técnica anterior, porque estas células proporcionan un perfil de glicosilación diferente que otros sistemas celulares humanos conocidos derivados de tejido diferente (p.ej. riñón o retina). Estas diferencias pueden ser ventajosas con respecto a actividad, homogeneidad y rendimiento de producto. Además, estas células pueden ser transfectadas y cultivadas en suspensión bajo condiciones exentas de suero.

Los métodos de la invención se definen en las reivindicaciones. Por tanto, según una primera realización, se proporciona un método para producir una composición molecular de proteína, que comprende

(a) introducir en una célula huésped que es una célula sanguínea humana inmortalizada, al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicha proteína; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de proteína; y

(c) aislar dicha composición molecular de proteína;

en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en GT-2X [DSM ACC2858], NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856], o una célula o línea celular derivada de las mismas; en donde la célula o línea celular derivada de DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6) o DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) es capaz de producir una composición de molécula proteica que

- no comprende NeuGc detectable;
- comprende NeuNAc enlazado en α2,6; y
- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula proteica de las moléculas proteicas en dicha composición de molécula proteica que es al menos 15% mayor en comparación con la misma cantidad de moléculas proteicas en al menos una composición de molécula proteica de la misma molécula proteica aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

Las células huésped que se pueden usar según la invención en conjunción con este método se definen en la reivindicación 1.

Según una segunda realización, se proporciona un método para producir una composición molecular de anticuerpo, que comprende

(a) introducir en una célula huésped que es una célula sanguínea humana inmortalizada de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicho anticuerpo; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo; y

(c) aislar dicha composición molecular de anticuerpo;

en donde la célula huésped se selecciona para producir una composición molecular de anticuerpo que tiene las siguientes características de glicosilación:

- no comprende NeuGc detectable;
- comprende NeuAc enlazado en α2-6; y
- tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular del anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 15% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC Nº CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y

en donde el anticuerpo es un anticuerpo entero terapéutico.

Este método que utiliza células sanguíneas humanas inmortalizadas mejora la producción de proteínas y en particular anticuerpos con respecto a actividad, rendimiento y/o homogeneidad. Esto es sorprendente, dado que hasta ahora no se había demostrado que las células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular células de leucemia mieloide son adecuadas para la producción de proteínas y particularmente conducen a anticuerpos con propiedades mejoradas respectivamente. Aunque se usó una cierta célula de leucemia de rata para la expresión de anticuerpos, la maquinaria de glicosilación entre ser humano y rata es críticamente diferente, por lo que esta última puede expresar restos de carbohidratos que pueden ser inmunogénicos en el ser humano, tales como NeuGc y Gal alfa1-3 Gal. Se describió que la célula de leucemia de rata YB2/0 da anticuerpos con actividad ADCC más alta debido a mayor presencia de bisecGlcNAc o debido a una drástica regulación en descenso de fucosa núcleo.

Fue aún más sorprendente que el problema podía ser solucionado por esta invención usando células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular células mieloides, dado que se había reportado previamente que la línea celular K562 - una célula de leucemia mieloide - no expresa la enzima para bisecGlcNAc, un hallazgo que fue descrito y mostrado por hibridación génica de GnTIII [Yoshimura M et al., Cancer Res. 56(2): 412-8 (1996)] y sí expresa el gen FUT8, que expresa la fucosiltransferasa que causa la adición de fucosa núcleo como se muestra por RT-PCR [ejemplo 1]. Fue sorprendente porque K562 no es resistente al tratamiento de lectina, dado que es unida fuertemente por la lectina LCA, la base para células negativas o fuertemente reguladas en descenso para fucosilación de núcleo. Debido a esta información sobre el perfil de glicosilación de células K562, no podía esperarse que esas células pudieran mejorar la actividad de anticuerpos expresados en las mismas, ya que se supuso que la maquinaria de glicosilación necesaria para un patrón de actividad favorable no estaba presente. También fue sorprendente que se pueden generar y conseguir proteínas, y en particular anticuerpos, con actividad de unión aumentada, homogeneidad mejorada y/o rendimientos más altos con el método de producción de la presente invención en comparación con células de sistemas de expresión actuales.

La estrategia de la invención es generar líneas celulares humanas adecuadas a fin de conseguir un sistema que pueda proporcionar productos proteicos con un conjunto entero de modificaciones post-translacionales tan cercano como sea posible al sistema humano y por tanto sin o con menos propiedades inmunogénicas y/o actividad mejorada en el sistema humano. El objetivo es proporcionar un patrón de glicosilación hecho a medida para cada proteína/anticuerpo a ser expresado.

Debido al hecho de que las estructuras de carbohidrato son muy complejas, que la maquinaria de glicosilación de células comprende varios cientos de enzimas que están implicadas en su síntesis y que esas enzimas son principalmente especies expresadas específicas y específicas a tejidos, la principal estrategia de los inventores para conseguir una glicosilación humana es proporcionar sistemas de expresión humana biotecnológicamente adecuados para expresar proteínas y en particular anticuerpos, con un patrón de glicosilación optimizado. Como el patrón de glicosilación optimizado puede diferir de proteína a proteína y de anticuerpo a anticuerpo, la invención proporciona líneas celulares que producen diferentes patrones de glicosilación, permitiendo de este modo seleccionar la línea celular para la producción que produce un patrón de glicosilación optimizado para el producto de proteína/anticuerpo respectivo.

Por tanto, la invención proporciona métodos biotecnológicamente favorables para la producción de composiciones proteicas y en particular composiciones moleculares de anticuerpos que tienen actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana. Proporciona además nuevas células huésped y composiciones moleculares de anticuerpos.

Por tanto, se proporciona un método para producir una composición proteica, preferiblemente una composición molecular de anticuerpos, que tiene un patrón de glicosilación definido, que comprende las siguientes etapas:

(a) introducir en una célula sanguínea humana inmortalizada como célula huésped al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma;

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína; y

(c) aislar dicha composición de proteína que tiene las características de glicosilación pretendidas.

A fin de obtener una composición de proteína y particularmente una composición de anticuerpo que tiene propiedades mejoradas, la célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína/anticuerpo que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

(i) No comprende NeuGc detectable.

Como se bosquejó anteriormente, una glicosilación NeuGc puede tener propiedades inmunogénicas en los seres humanos. Por tanto, es deseable evitar una glicosilación respectiva tanto como sea posible. Una glicosilación respectiva se evita usando células sanguíneas humanas inmortalizadas, y en particular usando una célula huésped de origen leucémico mieloide.

(ii) Tiene un grado de galactosilación, esto es, en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína aumentado en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC Nº CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Los residuos de galactosa se encuentran principalmente beta enlazados en 1-4 a los residuos GlcNAc en las antenas del complejo de tipo N-glicano de los anticuerpos, pero también se han encontrado enlaces beta-1,3. Sin embargo, usualmente aparecen en estructuras triantenarias. La influencia del grado de galactosilación sobre la actividad es, en particular con respecto a anticuerpos, notable. Se ha demostrado que el agotamiento de galactosa conduce a una actividad CDC reducida. Por tanto, puede preferirse tener un alto grado de galactosilación. La galactosilación también puede jugar un papel importante para otras proteínas. Cuando se hace referencia a la estructura de carbohidrato totales de una molécula de proteína, se consideran todas las glicosilaciones de la molécula de proteína. En caso de que se analicen las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína, el foco recae en una(s) estructura(s) de carbohidratos específica(s), tal como p.ej. la(s) estructura(s) de carbohidratos unida(s) a la Asn 297 de la parte Fc de una molécula de anticuerpo (por favor, véase también la Fig. 18). En caso de que se evalúe una estructura específica respectiva, se determina el contenido/composición de esta estructura específica. También se podría hacer referencia a unidades carbohidrato totales y cadenas de carbohidrato particulares para definir dichas características (estos son sinónimos).

(iii) Tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC Nº CRL-9096] cuando se expresa en la misma. En particular, en caso de que se produzca un anticuerpo según los métodos de la presente invención, una cantidad alta de estructuras G2 es beneficiosa. Una "estructura G2" define un patrón de glicosilación en donde se encuentra galactosa en ambos extremos de la estructura biantenaria unida a la región Fc en caso de un anticuerpo (por favor, véase también la Fig. 18). Si se encuentra una molécula de galactosa, se llama estructura G1, si no hay galactosa, estructura G0. Se encontró a menudo que un patrón de glicosilación G2 mejora la CDC de anticuerpos. Por tanto, se prefiere que esté presente una cantidad al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 95% o incluso más que 100% más alta de estructuras G2 en la composición de proteína/anticuerpo producida. Se describen en la presente memoria líneas celulares adecuadas que consiguen un patrón de glicosilación G2 alto respectivo.

Como un grado de glicosilación global alto es a menudo beneficioso para la CDC de los anticuerpos, se prefiere a menudo obtener 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso más que 95% de estructuras G2 y/o G1 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la proteína, en particular una molécula de anticuerpo.

Según una realización adicional, están presentes más que 35% (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% o más que 70%) de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína.

(iv) Tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Como se bosquejó anteriormente, un alto grado de galactosilación es usualmente ventajoso. Por tanto, las líneas celulares se seleccionan preferiblemente

de tal modo que se eviten estructuras G0. La cantidad de estructuras G0 es preferiblemente menor que 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o la cantidad es incluso más baja.

Según una realización adicional, están presentes menos que 22% (20%, 18%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, menos que 5%) de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición de proteína.

(v) No comprende Galalfa1-3Gal terminal detectable.

Como se bosquejó anteriormente, una glicosilación Galalfa1-3Gal puede ser inmunogénica en seres humanos. Esta glicosilación caracteriza un patrón, en donde un segundo residuo de galactosa está enlazado en posición alfa 1,3 al primer residuo de galactosa, dando como resultado el disacárido altamente inmunogénico Galalfa 1-3 Gal. Usando células sanguíneas humanas inmortalizadas y en particular una célula huésped de origen leucémico mieloide humana, se evita una glicosilación desventajosa respectiva.

(vi) Comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. Se encuentran residuos de fucosa en diferentes sitios dentro del árbol de N-glicano, así, particularmente:

- enlazada en alfa 1,6 al residuo GlcNAc proximal a la cadena de aminoácido;:
- enlazada en alfa 1,3 y alfa 1,4 al residuo GlcNAc antenario;
- enlazada en alfa 1,2 al residuo Gal antenario localizado.

En N-glicanos unidos a anticuerpos la inmensa mayoría de residuos de fucosa se encuentran enlazados en 1,6 al residuo GlcNAc proximal (llamado "fucosa núcleo"). Se ha encontrado que la ausencia de fucosa núcleo en el extremo reductor del N-glicano unido a anticuerpos potencia la actividad ADCC de anticuerpos en el factor 25 a 100. Debido a este efecto beneficioso sobre ADCC, se prefiere que la cantidad de fucosa sea al menos 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500% o más que 2000% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma. La presente invención también proporciona líneas celulares especialmente diseñadas que consiguen una fucosilación global baja respectiva.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una glicoproteína, que comprende al menos 10% (15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o más que 80%) de carbohidratos de las estructuras de carbohidrato totales o de al menos una estructura de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína, que carecen de fucosa. Con respecto a anticuerpos se prefiere particularmente que las cadenas de carbohidrato enlazadas por N-glicósido unidas a la región Fc comprenda un extremo reductor que comprenda GlcNAc, en donde las cadenas de carbohidrato no contienen fucosa unida a la posición 6 del GlcNAc en el extremo reductor de la cadena de carbohidrato.

(vii) Comprende al menos una estructura de carbohidrato que contiene GlcNAc bisectora.

La N-acetilglucosamina bisectora (bisGlcNAc) se encuentra a menudo unida en beta 1,4 al residuo de manosa central de la estructura núcleo de tri-manosilo de los N-glicanos encontrados en los anticuerpos. La presencia de GlcNAc bisectora en el residuo de manosa central del anticuerpo Fc-N-glicano aumenta la actividad ADCC de los anticuerpos.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona de tal modo que dicha proteína producida comprende más estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales (o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína) de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que no contiene fucosa ni GlcNAc bisectora que las estructuras de carbohidrato respectivas que contienen GlcNAc bisectora y no contienen fucosa. Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona de tal modo que dicha proteína producida comprende más estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales (o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína) de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene más GlcNAc bisectora y fucosa que las estructuras de carbohidrato respectivas que contienen GlcNAc bisectora y no contienen fucosa.

(viii) Tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]

cuando se expresa en la misma.

La influencia del grado/patrón de sialilación en la actividad, semivida y biodisponibilidad difiere entre diferentes proteínas/anticuerpos. Por tanto, es beneficioso determinar para cada molécula de proteína/anticuerpo el patrón de sialilación optimizado de antemano, usando el método de cribado descrito en la presente memoria, antes de establecer la producción con la célula huésped más adecuada, que proporciona el patrón de glicosilación deseado. P.ej. existen varias publicaciones que informan de un impacto negativo de residuos de ácido siálico presentes en el glicano Fc de anticuerpos en efectos corriente abajo, es decir, CDC y ADCC. Sin embargo, se encontró que una alta sialilación prolonga la semivida de las moléculas sialiadas. Por tanto, dependiendo de la proteína/anticuerpo producido, un patrón de sialilación diferente podría ser ventajoso, y la presente invención proporciona líneas celulares sanguíneas humanas inmortalizadas que tienen diferentes actividades de sialilación, permitiendo de este modo obtener proteínas/anticuerpos que presentan un patrón de glicosilación optimizado.

Según una realización, el producto tiene un grado de sialilación aumentado, con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o más que 500%) mayor en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Como se bosquejó anteriormente, un grado de sialilación respectivamente aumentado puede proporcionar un efecto positivo sobre la semivida en suero de la proteína prolongándola. En estos casos se prefiere usar una línea celular que proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] y que también proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] y que también proporciona un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células deficientes en sialilación (tales como p.ej. NM-F9 y NM-D4), en donde se necesita añadir un precursor a fin de permitir que ocurra la sialilación. Sin embargo, si bien se añade un precursor respectivo cuando se cultivan estas células deficientes en sialilación, estas células usualmente sólo alcanzan 50 a 60% del grado de sialilación que se obtiene con células sanguíneas humanas inmortalizadas que no tienen mutación/defecto genético en la maquinaria de glicosilación necesaria para la sialilación. Por tanto, para realizaciones en donde se tiene como objetivo un grado de sialilación más alto, se prefiere usar líneas celulares capaces de proporcionar un grado de sialilación alto respectivo, y no usar NM-F9 ni NM-D4.

Según una realización adicional, el producto comprende NeuNAc enlazado en alfa2-6. Adicionalmente, puede estar presente en algún grado NeuNAc enlazado en alfa2-3. Con respecto a algunas proteínas/anticuerpos la presencia de una glicosilación NeuNAc es beneficiosa, en particular con respecto a la semivida de la proteína/anticuerpo. Proporcionar un NeuNAc enlazado en alfa 2-6 es beneficioso, porque este patrón de glicosilación se asemeja a un patrón de glicosilación humano. Las células de roedor proporcionan usualmente un NeuNAc enlazado en alfa2-3. Tampoco otras líneas celulares humanas existentes son capaces de proporcionar una glicosilación de NeuNAc enlazado en alfa 2-6 suficiente.

Son líneas celulares adecuadas para proporcionar un patrón de glicosilación respectivo p.ej. NM-H9D8 y NM-H9D8-E6.

Según una realización adicional, se usa una célula huésped, que produce una proteína que comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente más cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

El perfil de carga de una cadena de carbohidrato también puede influir en las propiedades, y debe por tanto ser considerado. Son grupos químicos que cargan las cadenas de carbohidrato p.ej. grupos azufre o ácido siálico.

Según una realización alternativa, dicho producto comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente menos cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una glicoproteína, que comprende al menos 2% (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, o más que 45%) de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora.

Según una realización, se usa una célula huésped para la producción de la proteína, que presenta las siguientes propiedades

- tiene una actividad aumentada, rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- tiene un rendimiento medio o máximo aumentado que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- tiene una homogeneidad mejorada, que es una homogeneidad de glicosilación mejorada en donde dicha composición molecular de anticuerpo tiene un grado de sialilación más bajo que el grado de sialilación de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o
- en caso de que dicha molécula de proteína sea una molécula de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Como se bosquejó anteriormente, las propiedades respectivas pueden ser obtenidas optimizando la glicosilación de la proteína como se describe en la presente memoria. Fue sorprendente ver que también el perfil de unión puede ser alterado y mejorado con algunos anticuerpos en base al perfil de glicosilación. También se describen en la presente memoria células huésped adecuadas.

Según una realización adicional, la homogeneidad mejorada de dicha composición molecular de proteína es una homogeneidad de glicosilación mejorada de dicha composición molecular de proteína que comprende al menos una de las siguientes características:

- NeuGc no detectable;
- NeuNAc no detectable;
- más NeuNAc que una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];
- NeuNAc enlazado en alfa 2-6 detectable.

Según una realización adicional, dicha célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína que comprende moléculas de proteína que tienen uno de los siguientes patrones de glicosilación característicos:

(a)

- no comprende NeuGc detectable

- no comprende Galalfa1-3Gal detectable

- comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2

- tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2

- comprende bisecGlcNAc

- comprende una cantidad aumentada de ácido siálico en comparación con una composición de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] o en comparación con una línea celular deficiente en sialilación tal como NM-F9 y NM-D4.

(b)

- no comprende NeuGc detectable

- no comprende Galalfa1-3Gal detectable

- comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2

- tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2

- comprende bisecGlcNAc

- comprende una cantidad disminuida de ácido siálico en comparación con una composición de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

(c)

- no comprende NeuGc detectable

- no comprende Galalfa1-3Gal detectable

- comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2

- tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2

- comprende bisecGlcNAc

- comprende 2-6 NeuNAc.

Se describen en la Tabla 9 combinaciones características adecuadas adicionales que conducen a características mejoradas.

Según la presente invención el término "molécula de proteína" significa proteína de interés o fragmentos activos y/o mutantes de la misma, por lo que se puede usar cualquier proteína, preferiblemente cualquier glicoproteína de origen humano. El término molécula de proteína significa cualquier molécula polipeptídica o una parte de la misma. Puede ser codificada por uno o varios ácidos nucleicos. Puede ser producida de un modo secretorio o una fracción de la misma o una proteína de fusión con un compañero de fusión. Preferiblemente, la proteína es secretada en el sobrenadante. Esta realización es en particular beneficiosa con respecto al procedimiento de producción global, como p.ej. se pueden evitar etapas de liberación (p.ej. con ésteres de forbol).

Los ejemplos de glicoproteínas de mamíferos incluyen moléculas tales como citocinas y sus receptores, por ejemplo los factores de necrosis tumoral THF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotrofinas, p.ej. hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), tirotrofina, y gonadotrofina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIC, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocinasa, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrofina-3, -4, -5, -6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y Ii; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), p.ej. M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), p.ej. IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadhesinas; Glicoforina A; MUC1.

Muchas de las glicoproteínas mencionadas anteriormente pertenecen a las citocinas, haciendo referencia en la presente memoria a la clase general de hormonas que aparecen en células del sistema inmunitario, tanto linfocinas como monocinas, y otras. La definición pretende incluir, pero no se limita a, las hormonas que actúan localmente y no circulan en la sangre, y que, cuando se usan de acuerdo con la presente invención, darán como resultado una alteración de la respuesta inmune de un individuo. Los ejemplos de citocinas inmunomodulatorias adecuadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, interferones (p.ej. IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma), interleucinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-12), factores de necrosis tumoral (p.ej. TNF-alfa y TNF-beta), eritropoyetina (EPO), ligando FLT-3, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), CD2 e ICAM. Tomando la eritropoyetina, se cree que la molécula causa que maduren las células progenitoras a eritrocitos, mientras que se piensa que la trombopoyetina conduce a las células progenitoras a lo largo de la ruta trombocítica. CSF se refiere a una familia de linfoicinas que inducen a las células progenitoras encontradas en la médula ósea a diferenciarse en tipos específicos de células sanguíneas maduras. El tipo particular de célula sanguínea madura que resulta de una célula progenitora depende del tipo de CSF presente. De manera similar, la formación de colonias de granulocitos-macrófagos es dependiente de la presencia de GM-CSF. Adicionalmente, citocinas de otros mamíferos con homología sustancial a las formas humanas de IL-2, GM-CSF, TNF-alfa y otros, serán útiles en la invención cuando demuestren exhibir similar actividad sobre el sistema inmunitario. Se pueden emplear moléculas de adhesión o accesorias o combinaciones de las mismas, solas o en combinación con las citocinas.

De manera similar, las proteínas que sean sustancialmente análogas a cualquier proteína particular, pero tengan cambios relativamente menores de la secuencia de proteína, también encontrarán uso en la presente invención. Es bien sabido que pueden ser posibles a menudo algunas alteraciones pequeñas en la secuencia de aminoácidos en la secuencia de proteína, sin alterar las capacidades funcionales de la molécula de proteína, y por tanto se pueden hacer proteínas que funcionen como proteína parental en la presente invención pero difieran ligeramente de secuencias conocidas actuales. Por tanto también están comprendidas variantes respectivas que mantienen la función biológica.

Glicoproteínas preferidas se seleccionan del grupo que comprende Glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferones, interleucinas, anticuerpos y/ fragmentos de los mismos.

Todas las moléculas de proteína mencionadas anteriormente pueden ser fusionadas a otras secuencias de péptidos o polipéptidos tales como, pero no limitadas a, enlazadores, moléculas activadoras o toxinas.

En una realización preferida de la invención el ácido nucleico codifica una forma secretora de la proteína o un fragmento de la misma. En una realización preferida la forma secretora carece de dominios transmembrana.

De acuerdo con la presente invención, el término "composición molecular de proteína" significa las moléculas de cualquier molécula de proteína expresada según los métodos de la presente invención y en particular en una célula huésped de la invención que puede ser aislada. Dicha composición molecular de proteína comprende al menos una molécula de proteína. Dicha composición de proteína comprende al menos una glicoforma de una molécula de proteína. Dicha glicoforma de una molécula de proteína significa una molécula de proteína que lleva una glicosilación particular o cadena de carbohidrato que es diferente en al menos un bloque constructor de azúcar, por ejemplo, pero no limitado a, una galactosa adicional, ácido siálico, bisecGlcNAc, fucosa, u otra modificación de azúcar tal como, pero no limitada a, acetilación o sulfatación de otra glicoforma de la misma molécula de proteína. En otra realización de la invención la composición molecular de proteína puede comprender moléculas de más que una molécula de proteína expresada en una célula huésped. En una realización preferida la composición molecular de proteína de la invención comprende más moléculas en porcentaje de tal glicoforma o tales glicoformas de la molécula de proteína que median una actividad más alta que una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína obtenida de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

De acuerdo con la presente invención el término "molécula de anticuerpo" significa cualquier anticuerpo entero o fragmento de anticuerpo o una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo. Dicho anticuerpo entero puede ser cualquier anticuerpo o molécula de inmunoglobulina de cualquier clase o subclase o cualquier molécula que comprenda al menos un dominio de inmunoglobulina conocido por los expertos en la técnica, que comprenden, pero no se limitan a, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD de origen animal, tal como, pero no limitado a, origen humano, simio, roedor, ratón, rata, hámster, conejo, camello, ave, pollo o tiburón, y también puede ser una molécula que comprende secuencias de proteína de anticuerpos que se originan de diversos animales tales como anticuerpos quiméricos o humanizados donde diversos porcentajes de por ejemplo secuencias murinas y humanas son combinados a anticuerpos enteros y/o son mutados por ejemplo para disminuir la inmunogenicidad o aumentar la afinidad como saben los expertos en la técnica. En otra realización de la invención dicho anticuerpo entero también puede ser el anticuerpo entero descrito anteriormente con al menos una secuencia de aminoácidos o polipéptidos adicional.

En una realización preferida dicho anticuerpo entero es un IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM humano, humanizado o quimérico que comprende una región Fc humana. En una realización incluso más preferida de la invención dicho anticuerpo entero es un IgG1, IgG4 o IgM humano, humanizado o quimérico con una región Fc humana. Dicha región Fc humana comprende al menos una secuencia de 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos de un dominio constante de la región Fc de un anticuerpo humano, preferiblemente comprende al menos un dominio Fc de un anticuerpo humano, más preferiblemente comprende el dominio Cgamma2 humano, y más preferiblemente comprende todos los dominios constantes de la región Fc de un anticuerpo humano de una cierta clase o subclase. Dicha región Fc humana también puede comprender secuencias humanas de las que al menos un aminoácido fue mutado.

En la realización más preferida de la invención la molécula del anticuerpo entero es (i) un anticuerpo totalmente humano generado por ejemplo a partir de una célula o células sanguíneas productoras de anticuerpos humanos o a partir de un ratón transgénico en el que el locus del gen del anticuerpo del ratón es al menos parcialmente intercambiado por secuencias de anticuerpo humano, o bien (ii) un anticuerpo entero humanizado en el que al menos partes de las regiones variables de un anticuerpo murino o de rata, tales como las regiones de armazón o al menos un aminoácido de un armazón, fueron intercambiadas a secuencias humanas o mutadas para ser menos inmunogénicas en seres humanos que comprenden dominios constantes humanos, o bien (iii) un anticuerpo entero quimérico en el que la región variable es de murino o rata y comprende dominios constantes humanos.

Dichos anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos enteros humanizados y anticuerpos enteros quiméricos o partes de los mismos, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar y seleccionar estas moléculas de anticuerpo con o sin secuencias adicionales adecuadas, así como los métodos para construir,

identificar, probar, optimizar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

Dicho fragmento de anticuerpo es cualquier fragmento de un anticuerpo que comprende al menos 20 aminoácidos de dicho anticuerpo entero, preferiblemente al menos 100 aminoácidos. En una realización preferida el fragmento de anticuerpo comprende la región de unión del anticuerpo tal como un Fab, F(ab)2, multicuerpos que comprenden múltiples dominios de unión tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, anticuerpo de dominio único o aficuerpos. En otra realización preferida el fragmento de anticuerpo comprende la región Fc con todo o partes de sus dominios constantes, preferiblemente que comprende el segundo dominio (dominio Cgamma2). En otra realización el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo entero truncado donde al menos un aminoácido, tramos de polipéptido o dominios enteros son suprimidos. Esas moléculas pueden ser combinadas con secuencias adicionales para estabilización o para mejorar la unión de las moléculas tales como enlazadores.

Dicha molécula que comprende un fragmento de anticuerpo es cualquier molécula que comprende cualquiera de dichos fragmentos de anticuerpo u otros dominios de inmunoglobulina de al menos 20 aminoácidos. En una realización preferida dicha molécula que comprende un fragmento de anticuerpo son moléculas de fusión donde un fragmento de anticuerpo está fusionado a otras secuencias de proteína tales como secuencias efectoras, por ejemplo citocinas, factores co-estimulatorios, toxinas o fragmentos de anticuerpo de otros anticuerpos a fin de generar moléculas con múltiples especificidades de unión tales como anticuerpos bi- o tri-específicos, o secuencias de multimerización tales como dominios MBP (proteína de unión a la manosa) para dar como resultado la multimerización de dominios de unión, o secuencias para la detección, purificación, secreción o estabilización tales como etiquetas, señales de localización o enlazadores, o similares. En otra realización preferida dicha molécula que comprende un fragmento de anticuerpo son moléculas de fusión que comprenden la región Fc de un anticuerpo entero o partes del mismo, preferiblemente que comprenden el segundo dominio constante (dominio Cgamma2). Dichas moléculas de fusión son fusionadas por medios genéticos, donde las moléculas son codificadas por un ácido nucleico o son fusionadas por co-expresión de al menos dos ácidos nucleicos, por lo cual la fusión es causada por interacciones de proteína no covalentes o covalentes o son fusionadas por una combinación de ambos. La fusión genética entre un fragmento de anticuerpo y otra secuencia de polipéptido o molécula de proteína puede conseguirse por ingeniería genética donde ambas partes son codificadas por un único ácido nucleico con o sin aminoácidos adicionales entre medias. En una realización preferida adicional dichas moléculas de fusión comprenden al menos una región de unión de un fragmento de anticuerpo tal como un anticuerpo de dominio único, o Fab o una secuencia de unión no derivada de anticuerpos, tal como un dominio de lectina, y una región Fc o partes de la misma que comprenden el segundo dominio (dominio Cgamma). En otra realización preferida, las moléculas de fusión comprenden IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF, una toxina de péptido, o partes de la misma. Son fusionadas p.ej. por medios genéticos, donde las moléculas son codificadas por un ácido nucleico o son condensadas por co-expresión de al menos dos ácidos nucleicos, por lo cual la fusión es causada por interacciones de proteína no covalentes o covalentes o son fusionadas por un comion de un fragmento de anticuerpo tal como un anticuerpo de dominio único, Fab o Fab que está enlazado a secuencia de multimerización de MBP.

Todas aquellas moléculas de anticuerpo o partes de las mismas así como los métodos para construir, identificar, probar y seleccionar estas moléculas de anticuerpo con o sin secuencias adicionales adecuadas, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención el término "composición molecular de anticuerpo" significa las moléculas de cualquier molécula de anticuerpo expresadas en una célula huésped de la invención que puede ser aislada. Dicha composición molecular de anticuerpo comprende al menos una molécula de anticuerpo. Dicha composición de anticuerpo comprende al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo. Dicha glicoforma de una molécula de anticuerpo significa una molécula de anticuerpo que lleva una glicosilación particular o cadena de carbohidrato que es diferente en al menos un bloque constructor de azúcar, por ejemplo, pero no limitado a, una galactosa adicional, ácido siálico, bisecGlcNAc, fucosa, u otra modificación de azúcar tal como, pero no limitada a, acetilación o sulfatación de otra glicoforma de la misma molécula de anticuerpo. En otra realización de la invención la composición molecular de anticuerpo puede comprender moléculas de más que una molécula de anticuerpo expresada en una célula huésped. En una realización preferida la composición molecular de anticuerpo de la invención comprende más moléculas en porcentaje de tal glicoforma o tales glicoformas de la molécula de anticuerpo que median una actividad más alta que una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo obtenida de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida adicional la composición molecular de anticuerpo de la invención comprende más moléculas de tal glicoforma o glicoformas de la molécula de anticuerpo en porcentaje que median en una citotoxicidad celular mediada por Fc más alta y/o una unión mejorada que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo obtenida de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

De acuerdo con la presente invención el término "célula huésped de origen leucémico mieloide" o formulaciones equivalentes significa cualquier célula o línea celular de origen leucémico mieloide, o cualquier célula o línea celular mieloide humana o precursora mieloide que pueda ser obtenida de un paciente con leucemia, o cualquier célula o

línea celular mieloide humana o precursora mieloide que pueda ser obtenida de un donante humano, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una de esas células mencionadas anteriormente.

En otra realización de la invención dicha célula huésped de origen leucémico mieloide humano o dicha célula sanguínea humana inmortalizada de la invención también comprende tales células o líneas celulares que fueron obtenidas fusionando al menos una de las células huésped mencionadas anteriormente, en particular las de origen leucémico mieloide, con otra célula de origen humano o animal, tales como, pero no limitadas a, linfocitos B, células CHO. Los expertos en la técnica pueden identificar y usar fuentes y métodos adecuados para obtener, generar y/o inmortalizar células adecuadas de seres humanos para células huésped adecuadas de origen leucémico mieloide humano.

El término célula o línea celular derivada de dicha célula huésped significa cualquier célula o línea celular que puede ser obtenida por cualquier medio de cultivo y clonación con o sin mutación previa o ingeniería genética de dicha célula huésped de origen leucémico mieloide, y comprende la selección de aquellas células o líneas celulares derivadas de dicha célula huésped con las propiedades deseadas. Dicho cultivo y clonación se basa en el hecho de que se pueden obtener clones de células con diferentes propiedades a partir de cultivos celulares primarios, cultivos de células e incluso cultivos de clones de células por rondas múltiples de pasaje y clonación de las células usando preferiblemente métodos de clonación de célula única tales como dilución limitada o clasificación de células basada en citometría de flujo. En una realización preferida dicha célula o línea celular derivada de dichas células huésped se selecciona por unión a una lectina o anticuerpo de unión a carbohidratos. Dicha mutación puede ser realizada por tratamiento conocido por los expertos en la técnica con mutágenos físicos, químicos o biológicos, tales como, pero no limitados a, radiación, agentes alquilantes o EMS (metanosulfonato de etilo), proteínas tales como lectinas, o partículas de virus. Dicha ingeniería genética puede ser realizada por métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como eliminación de genes por medio de recombinación homóloga específica a sitio, uso de transposones, mutagénesis específica a sitio, transfección de ciertos ácidos nucleicos, o silenciamiento de genes, o productos génicos. Los métodos para dicho cultivo y clonación, dicha mutación y mutágenos y dicha ingeniería genética son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen algunos ejemplos en detalle en el documento de patente WO2005/017130 A2, el documento de patente US 2003/0115614 A1, o se describen en la presente memoria. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o adoptar y/o modificar un método adecuado o combinación de métodos para la generación de una célula o línea celular adecuada derivada de dicha célula huésped de la invención.

Dichas célula o líneas celulares derivadas de dicha célula huésped se seleccionan debido a propiedades de esas células que son ventajosas cuando se comparan con su célula o línea celular parental, tales como, pero no limitadas a, tiempos de doblaje más cortos, crecimiento más rápido, posibilidad de crecer bajo densidades más altas, pueden producir más, crecen bajo condiciones exentas de suero y/o en medios exentos de proteínas, eficacias de clonación más altas, eficacias de transfección más altas para ADN, velocidades de expresión más altas de composiciones moleculares de anticuerpos, actividades más altas para una composición molecular de anticuerpo expresada en las mismas, homogeneidades más altas de una composición molecular de anticuerpo expresada en la presente memoria, y/o robustez más alta para aumentar a escala. Los métodos para seleccionar las células con propiedades ventajosas son conocidos por los expertos en la técnica o se describen en la presente memoria. Un método para generar una célula huésped de la invención puede comprender (a) incubar una célula de leucemia mieloide humana con una lectina o un anticuerpo que reconoce un epítopo desialilado o un epítopo que carece de un ácido siálico pero que se une no o sólo significativamente menos a la forma sialilada del epítopo, y (b) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (c) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado, y (d) seleccionar una célula, células o un clon de célula que se une fuertemente a una lectina o un anticuerpo que se une a un epítopo con ácido siálico.

Es más preferido el método descrito anteriormente, en donde dicha lectina o dicho anticuerpo que reconoce un epítopo desialilado o un epítopo que carece de un ácido siálico es Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, o PNA, y en donde dicha célula de leucemia mieloide humana es la línea celular K562, KG-1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, H9, NM-H10.

El método para generar una célula huésped de la invención con alta sialilación y propiedades biotecnológicas favorables tales como rápido crecimiento celular comprende (i) incubar una célula de leucemia mieloide humana de la invención como célula originadora, preferiblemente K562, con una lectina o preferiblemente un anticuerpo que reconoce un epítopo desialilado o un epítopo que carece de un ácido siálico pero que se une no o menos a la forma sialilada del epítopo, tal como, pero no limitado a, Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, o PNA (lectina de Arachis hypogaea, aglutinina de cacahuete), preferiblemente unido a perlas magnéticas, y (ii) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (iii) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado, y (iv) seleccionar una célula, células o un clon de células, preferiblemente después de clonación celular única, que se une fuertemente a una lectina o un anticuerpo que se une a un epítopo con ácido siálico, tal como SNA (aglutinina de Sambucus nigra) o MAL (lectina de Maackia amurensis), MAL I (lectina de Maackia amurensis I), preferiblemente SNA.

Un método para generar una célula huésped de la invención con alta sialilación y propiedades biotecnológicas favorables tales como rápido crecimiento celular puede comprender (i) incubar K562 con Nemod-TF1, Nemod-TF2,

A78-G/A7, o PNA unido a perlas magnéticas, y (ii) aislar células unidas a dicha lectina o anticuerpo, y (iii) cultivar las células aisladas durante un tiempo adecuado de aproximadamente una a 6 semanas, y (iv) seleccionar un clon de células después de clonación celular única, que se une fuertemente a SNA. En una realización preferida esas células se unen más fuertemente a SNA que la célula originadora, y en otra realización preferida crecen más rápido que la célula originadora.

En una realización preferida la célula originadora se trata con metanosulfonato de etilo antes de la etapa (i).

Los expertos en la técnica pueden seleccionar condiciones y métodos adecuados y optimizarlos para generar estas células huésped. Se pueden encontrar más detalles para algunas de las etapas en las solicitudes de patente internacional WO2005/017130 A2 y WO2005/080585 A1.

Se pueden usar células sanguíneas humanas inmortalizadas como células huésped, que se seleccionan de los siguientes grupos 1 a 4:

(a) grupo 1, que comprende células huésped que tienen una alta actividad de sialilación tal como K562;

(b) grupo 2, que comprende células huésped que tienen debido a una deficiencia genética o medios de inhibición de la expresión (p.ej. RNAi) una baja o ninguna sialilación; actividad comparable a y que incluye NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] y GTX-2;

(c) grupo 3, que comprende células huésped que tienen un grado de sialilación más alto que K562 tales como NM-H9 y NM-H9D8;

(d) grupo 4, que comprende células huésped que tienen una baja o incluso ninguna actividad de fucosilación tales como NM-H9D8-E6 y NM H9D8-E6Q12.

Las líneas celulares que se pueden usar según la invención en conjunción con el método para producir una composición molecular de proteína se definen en la reivindicación 1.

En una realización preferida, dicha línea celular generada es NM-H9D8. Como clon celular más preferido generado por el método descrito anteriormente, se seleccionó NM-H9D8 y se depositó bajo DSM ACC 2806 en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 15 de septiembre de 2006. Otros clones celulares tales como NM-E-2F9, NM-C-2F5 o NM-H9D8-E6 (DSM ACC 2807) se seleccionaron por incubación de las células parentales con una o más lectinas y siguiendo clonación celular única usando clasificación celular por citometría de flujo, por lo que se realizó un procedimiento de selección positiva o una combinación de selección positiva y negativa. Para obtener clones celulares con características estables los clones celulares obtenidos se reclonaron al menos una vez por dilución limitada como se describe anteriormente.

En una realización preferida dicha célula sanguínea humana inmortalizada que es una célula huésped de origen leucémico mieloide, crece y produce la composición molecular de proteína/anticuerpo de la invención bajo condiciones exentas de suero. En una realización incluso más preferida dicha célula sanguínea humana inmortalizada que es una célula huésped de origen leucémico mieloide crece bajo condiciones exentas de suero. Además, también el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y la composición molecular de proteína/anticuerpo también puede ser aislada bajo condiciones exentas de suero. Poder trabajar bajo condiciones exentas de suero es particularmente importante cuando se preparan proteínas terapéuticas, ya que las contaminaciones de suero son inaceptables en el proceso regulatorio.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, KG1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, o una mezcla de células o líneas celulares que comprende al menos una de esas células mencionadas anteriormente. La célula huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], o NM-H9D8-E6 DSM ACC 2807, o NM H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856), GT-2X (depositada bajo DSM ACC 2858 en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 7 de septiembre de 2007) o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de estas líneas celulares.

Las células NM-F9 [DSM ACC2606] y NM-D4 [DSM ACC2605] fueron depositadas por Nemod Biotherapeutics GmbH & Co.KG, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania), que autorizó al solicitante a hacer referencia al material biológico depositado descrito en la presente memoria.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, tal como K562

[ATCC CCL-243], o una célula o línea celular derivada de dicha célula huésped.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, o GT-2X, o NM H9D8-E6Q12 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula, células o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, o GT-2X, o NM H9D8-E6Q12 que crecen y producen una composición molecular de anticuerpo de la invención bajo condiciones exentas de suero, y lo más preferido en la presente memoria una célula, células o línea celular que crecen bajo condiciones exentas de suero y el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo puede ser introducido en estas células y se aísla una composición molecular de anticuerpo bajo condiciones exentas de suero.

Una célula huésped de origen leucémico mieloide humano puede ser la célula, células o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, GT-2X, o NM-H9D8-E6, o NM H9D8-E6Q12 que crecen y producen una composición molecular de anticuerpo de la invención bajo condiciones exentas de suero, y lo más preferido en la presente memoria una célula, células o línea celular que crecen bajo condiciones exentas de suero y el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo puede ser introducido en estas células y se aísla una composición molecular de anticuerpo bajo condiciones exentas de suero.

Según una realización, la célula sanguínea humana inmortalizada y la célula huésped de origen leucémico mieloide humano no es una de las líneas celulares deficientes en sialilación NM-F9 y NM-D4 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped que tienen las mismas propiedades. Esta realización es beneficiosa en caso de que se tenga como objetivo un alto grado de sialilación. Para estas realizaciones, la célula huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en K562, NM H9D8, NM H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12 y células huésped derivadas de cualquiera de estas células huésped.

Las líneas celulares descritas en conjunción con la presente invención tiene un tiempo de doblado de 14 a 24 horas, que es muy rápido en comparación con otros sistemas de expresión mamíferos, dependiendo de la línea celular de la invención.

Además, no se conoce un sistema vectorial de alta expresión adecuado general para expresión de anticuerpos de alto rendimiento en líneas celulares humanas, dado que las células humanas normalmente no carecen del gen DHFR y por tanto no permiten el uso del sistema de amplificación dhfr/metotrexato. Por tanto, según una realización adicional se proporciona una realización que permite aumentar el rendimiento de producto.

Según esta realización, adicionalmente se introduce un ácido nucleico en la célula huésped, que codifica una variante DHFR resistente al antifolato. La dihidrofolato reductasa, o DHFR, reduce el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico, usando DADPH como donador de electrones, que puede ser convertido en los tipos de cofactores de tetrahidrofolato usados en la química de la transferencia del carbono 1. Los antifolatos inhiben la enzima DHFR, conduciendo a muerte celular. Para proporcionar un ácido nucleico que codifica una variante DHFR resistente al antifolato, se proporciona una herramienta para seleccionar células que fueron transfectadas con el ácido nucleico y además, permite una amplificación de los ácidos nucleicos a ser expresados en las células huésped.

El ácido nucleico que codifica dicha variante DHFR resistente al antifolato puede ser p.ej. introducido por medio de un vector independiente al ácido nucleico que codifica la proteína/anticuerpo a ser expresado en la célula huésped. Se prefiere transfectar el vector que codifica la variante DHFR resistente al antifolato básicamente al mismo tiempo que el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína/anticuerpo. Esta realización estimula que el ácido nucleico que codifica dicha proteína/anticuerpo a ser expresada se integre en el genoma de la célula huésped en el mismo sitio genético que el ácido nucleico que codifica la variante DHFR resistente al antifolato, lo que es beneficioso en caso de que se desee una amplificación del ácido nucleico que codifica dicha proteína/anticuerpo.

Alternativamente, se puede usar un sistema vectorial que comprende el ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicha proteína a ser expresada así como el ácido nucleico que codifica la variante DHFR resistente al antifolato.

Las células huésped son cultivadas después con dicho antifolato. Esto tiene el efecto de que esas células huésped, que fueron transfectadas con éxito con el ácido nucleico que codifica dicha variante DHFR resistente al antifolato, pueden crecer a pesar de la presencia del antifolato. De este modo se pueden seleccionar células transfectadas con éxito.

Según una realización adicional, la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de dicha proteína/anticuerpo es amplificada por etapas aumentando la concentración de antifolato en el cultivo. El aumento de la concentración de antifolato en el medio de cultivo conduce a un aumento de las copias de la variante DHFR resistente al antifolato en el genoma. Se supone que esto se consigue por eventos de recombinación en las células. De este modo, también el número de copias del ácido nucleico que codifica al menos parte de la proteína a ser expresada es también aumentado si el ácido nucleico que codifica dicha proteína está situado cerca de la variante DHFR resistente al antifolato en el genoma, lo que puede ser promovido transfectando vectores independientes simultáneos o usando un vector que comprende ambas secuencias de ácido nucleico. Mediante este mecanismo se

obtienen células huésped que expresan la proteína/anticuerpo en un rendimiento más alto.

Preferiblemente, el antifolato es metotrexato.

La secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o una parte de la misma, es amplificada preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de antifolato, preferiblemente metotrexato, por lo que la concentración de dicho antifolato, preferiblemente metotrexato, es aumentada en al menos 100% en cada ronda sucesiva.

Un ácido nucleico adecuado para proporcionar dicha variante DHFR resistente al antifolato codifica un polipéptido del grupo de secuencia ID No. 1 a 9, preferiblemente secuencia ID No. 1.

Se describen con más detalle también más detalles y realizaciones de este sistema de amplificación a continuación.

Un método para producir una proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, puede comprender:

(a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína y preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1; y

(b) amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, cultivando dicha célula huésped con metotrexato, preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato, por lo que la concentración de metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva; y

(c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, y

(d) aislar dicha proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo.

Un método para producir una composición de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada puede comprender:

(a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma; y

(b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo; y

(c) aislar dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada.

Un método para producir una composición de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada puede comprender:

(a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1; y

(b) amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma cultivando dicha célula huésped con metotrexato, preferiblemente cultivando dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato, por lo que la concentración de metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva; y

(c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo; y

(d) aislar dicha composición de proteína, que preferiblemente es una composición molecular de anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada.

Dicho ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de ella y dicho ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, puede ser un ácido nucleico o dos ácidos nucleicos independientes.

Para seleccionar una célula huésped adecuada para obtener una proteína que tiene un perfil de glicosilación optimizado, es ventajoso realizar el método de cribado/selección descrito en la presente memoria. Después de que se ha determinado una célula huésped adecuada por el método de selección, dicha célula huésped se usa entonces para producir una proteína como se describe en la presente memoria.

Un método para seleccionar una célula huésped para producir una proteína puede tener al menos una de las siguientes características de glicosilación:

(i) no comprende NeuGc detectable; y/o

(ii) tiene un grado de galactosilación en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que está aumentado en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y/o

(iii) tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y/o

(iv) tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y/o

(v) no comprende Galalfa1-3Gal terminal detectable; y/o

(vi) comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y/o

(vii) comprende al menos una estructura de carbohidrato que contiene GlcNAc bisectora; y/o

(viii) tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;

por las siguientes etapas

(a) introducir en al menos dos células sanguíneas humanas inmortalizadas diferentes como células huésped al menos un ácido nucleico que codifica una proteína o al menos una parte de la misma; y

(b) cultivar dichas al menos dos células huésped diferentes, en donde cada célula huésped diferente produce una composición de proteína que tiene un patrón de glicosilación que diverge del patrón de glicosilación producido por la otra célula huésped;

(c) aislar dichas composiciones de proteína expresada que llevan un patrón de glicosilación diferente de las al menos dos células huésped diferentes; y

(d) seleccionar dicha célula huésped que produce una composición de proteína que tiene al menos una de las características de glicosilación definidas en (i) a (viii).

Los detalles con respecto al patrón de glicosilación y líneas celulares adecuadas para obtener dicho patrón se describen anteriormente y son también aplicables a y adecuadas para el método de cribado para seleccionar una célula huésped adecuada.

Realizar una etapa de cribado respectiva antes de establecer el método de producción descrito en la presente memoria es ventajoso, ya que esta realización permite la selección de la célula huésped más adecuada para producir la composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene un patrón de glicosilación optimizado. Según la idea básica de este sistema de cribado, la proteína de interés es expresada en al menos dos líneas celulares diferentes que tienen un patrón de glicosilación divergente. P.ej. una línea celular puede presentar un alto grado de sialilación y la otra puede presentar un bajo grado de sialilación (o fucosilación y/o galactosilación) o incluso características de glicosilación desconocidas. Los productos obtenidos a partir de las diferentes líneas celulares, por consiguiente, llevan un patrón de glicosilación característico para la línea celular respectiva.

Las características de las proteínas producidas en las diferentes líneas celulares p.ej. con respecto a su actividad (p.ej. ADCC y CDC en anticuerpos), afinidad, semivida en suero y otras características importantes pueden ser determinadas entonces. Los resultados permiten elegir la línea celular que tiene la mejor maquinaria de glicosilación a fin de obtener una proteína que está optimizada con respecto a su patrón de glicosilación. Como las características decisivas (p.ej., afinidad, semivida en suero, etc.) varían, este método es particularmente ventajoso.

Preferiblemente, dicha proteína a ser producida presenta al menos una de las siguientes características:

(a) en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o

(b) en caso de que sea una composición molecular de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; y/o

(c) tiene un rendimiento medio o máximo aumentado de dicha composición molecular de proteína que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Según una realización, al menos una de dichas células huésped es una célula sanguínea humana inmortalizada, y preferiblemente una célula de origen leucémico mieloide humano tal como K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas.

Dicha al menos una célula huésped de origen leucémico mieloide humano se puede seleccionar de uno de los siguientes grupos 1 a 4:

(a) grupo 1, que comprende células huésped que tienen una alta actividad de sialilación tales como K562 o una célula o línea celular derivada de la misma;

(b) grupo 2, que comprende células huésped que tienen debido a una deficiencia genética o medios de supresión de la expresión (p.ej. RNAi) una baja o ninguna sialilación, tales como NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] y GTX-2 o una célula o línea celular derivada de las mismas;

(c) grupo 3, que comprende células huésped que tienen un grado de sialilación más alto que K562, tales como NM-H9 y NM-H9D8 o una célula o línea celular derivada de las mismas;

(d) grupo 4, que comprende células huésped que tienen una baja o ninguna actividad de fucosilación, tales como NM-H9D8-E6 o una célula o línea celular derivada de las mismas.

Preferiblemente, al menos dos o tres células huésped usadas en el procedimiento de cribado se seleccionan de los grupos anteriores. Sin embargo, también es posible incluir otras células huésped derivadas de otro origen (p.ej. células Hek 293) en el sistema de cribado a fin de ampliar más los diferentes patrones de glicosilación analizados.

La célula huésped obtenida produce preferiblemente una proteína, en particular un anticuerpo que presenta al menos uno de los patrones de glicosilación mostrados en la Tabla 9.

Según la invención el término introducir un ácido nucleico significa cualquier método conocido por los expertos en la técnica para introducir un ácido nucleico, o dos o más ácidos nucleicos en una célula o células huésped mamíferas por métodos tales como, pero no limitados a, electroporación, transfección usando lípidos catiónicos, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, o infección por partículas de virus tales como adenovirus o retrovirus o una combinación de los mismos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar un método adecuado para la introducción de uno o más ácidos nucleicos de la invención.

De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo es cualquier ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma. La molécula de anticuerpo de la invención puede ser codificada de este modo por una única o por múltiples moléculas de ácido nucleico.

Dicha parte de una molécula de anticuerpo codificada por dicho ácido nucleico comprende al menos una secuencia de 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos de una molécula de anticuerpo o de un dominio constante y/o variable de la molécula de anticuerpo. La secuencia comprendida que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma puede ser separada por al menos otra secuencia, tal como p.ej. un intrón. La secuencia de un dominio puede comprender al menos una mutación de aminoácidos.

De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que codifica una molécula de proteína es cualquier ácido nucleico que codifica la molécula de proteína o al menos una parte de la misma. La molécula de proteína puede ser

codificada de este modo por una única o por múltiples moléculas de ácido nucleico. La secuencia que codifica la molécula de proteína o al menos una parte de la misma puede ser separada por al menos otra secuencia, tal como p.ej. un intrón. La secuencia de la molécula de proteína puede comprender al menos una mutación de aminoácidos.

En una realización preferida el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de ella comprende al menos un dominio variable y/o un dominio constante de la molécula de anticuerpo, más preferiblemente ambos, más preferiblemente tal que comprende una secuencia humana al menos en la parte del dominio o dominios constantes, e incluso más preferido tal que comprende el dominio Cgamma2 humano, y lo más preferiblemente comprende todos los dominios constantes de la región Fc de un anticuerpo humano de una cierta clase o subclase y el dominio variable.

Según una realización la proteína y en particular la molécula de anticuerpo es codificada por un único ácido nucleico. En otra realización preferida la proteína, en particular una molécula de anticuerpo, es codificada por dos ácidos nucleicos o por tres ácidos nucleicos.

En una realización preferida adicional un ácido nucleico codifica una parte de la molécula de anticuerpo que codifica para el dominio variable y/o constante de la cadena ligera, y otro ácido nucleico codifica para otra parte de la molécula de anticuerpo que codifica para el dominio variable y/o al menos un dominio constante de la cadena pesada.

De acuerdo con la presente invención el ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 significa que dicho ácido nucleico codifica para al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1. Cualquier número de estas secuencias es adecuado, siempre y cuando pueda ser introducido con éxito en la célula huésped de la invención. En una realización preferida dicho ácido nucleico codifica para uno, dos o tres polipéptidos del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, más preferiblemente para un polipéptido, y lo más preferiblemente para el polipéptido de secuencia #1.

En el sentido de la invención dicho ácido nucleico también puede codificar para un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, que tiene al menos una mutación de aminoácidos, siempre y cuando esta mutación permita la amplificación del ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma mediante metotrexato como se describe en otras partes de la presente memoria.

La secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, puede ser parte de la misma molécula de ácido nucleico que el ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria o en moléculas de ácido nucleicos independientes.

En otra realización preferida de la invención un ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1, puede ser introducido en la célula huésped de la invención independientemente de dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican la molécula de anticuerpo o partes de la misma de la invención. Esto puede hacerse introduciendo dicho ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, junto con, antes o después de introducir dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican la molécula de anticuerpo o partes de la misma de la invención. En una realización preferida esto se realiza en paralelo, y en otra realización preferida la célula huésped de la invención ya comprende dicho ácido nucleico independiente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

Se describen realizaciones preferidas adicionales en los ejemplos.

La amplificación de dicho ácido nucleico establemente introducido o varias copias de dicho ácido nucleico que codifica la proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o fracción del mismo, puede ser realizada como se describe en otras partes de la presente memoria y en los ejemplos usando metotrexato.

En una realización preferida el ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, comprende al menos otro elemento genético que permite la selección de aquellas células en las que el ácido nucleico fue introducido con éxito, tales como, pero no limitados a, genes con resistencia a antibióticos, tal como, pero no limitado a, el elemento genético que codifica para una resistencia a puromicina o neomicina. Además estos ácidos nucleicos comprenden uno o varios elementos genéticos tales como promotores, potenciadores, sitios de poliadenilación, y/o intrones, para expresión de la molécula de anticuerpo en las células huésped de la invención, y elementos genéticos tales como de origen bacteriano de replicación, promotores y elementos para selección de bacterias transfectadas tales como genes de resistencia a antibióticos para multiplicar el ácido nucleico en una bacteria.

Los promotores adecuados incluyen el promotor del gen IE (temprano inmediato) del citomegalovirus (CMV), promotor temprano SV40, el promotor de un retrovirus, promotor de metalotioneina, promotor del choque de calor,

promotor SR alfa, promotor EF-1 alfa, etc. El potenciador del gen IE del CMV humano se puede usar en combinación con el promotor.

Esos y más elementos genéticos son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser seleccionados, combinados, optimizados e introducidos en dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente un molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o combinar el elemento genético adecuado, construir los consiguientes vectores de ácido nucleico o elementos para introducir uno o más ácidos nucleico en una línea celular según la invención.

Dicho ácido nucleico o combinación de ácidos nucleicos que codifican la proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, así como dichos elementos genéticos adicionales, así como los métodos para introducirlos, tal como transfectarlos en las células huésped de la invención para expresión de la composición molecular de anticuerpo o en bacterias para multiplicación son conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar, seleccionar y combinar estos ácido o ácidos nucleicos y combinarlos con secuencias adicionales adecuadas para la selección de aquellas células que están transfectadas con éxito, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

Se describen en detalle realizaciones preferidas de la invención en los ejemplos.

En una realización preferida de la invención el ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, comprende un elemento genético para la selección de aquellas células huésped de la invención en las que el ácido nucleico está introducido con éxito, tal como, pero no limitado a, neomicina o puromicina, más preferiblemente comprende además un promotor tal como EF-1 alfa o promotor CMV, más preferiblemente comprende además un potenciados CMV, más preferiblemente comprende además un elemento genético que permite la selección de bacterias que están transfectadas con el ácido nucleico y un elemento genético para replicación tal como el origen de replicación ColE1 para multiplicación de dicho ácido nucleico en bacterias, e incluso más preferiblemente comprende además un elemento genético para multiplicación de dicho ácido nucleico en células COS tales como el origen SV40. Estos elementos son conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser seleccionados, combinados, optimizados y usados por los expertos en la técnica.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende una secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente dicho ácido nucleico que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, o resistencia a neomicina, o una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante de la cadena pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo o el dominio variable y todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo entera.

En una realización incluso más preferida de la invención uno de dicho ácido nucleico descrito anteriormente codifica al menos una parte de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo y un segundo de dicho ácido nucleico descrito anteriormente codifica al menos otra parte de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo, ambos ácidos nucleicos son introducidos en la misma célula huésped de la invención. Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina y el otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican dos secuencias de aminoácidos de la molécula de proteína o al menos una parte de la misma.

Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, un otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina. Más preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina o neomicina, preferiblemente resistencia a puromicina, y el otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia

seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico descrito anteriormente que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma comprende tres secuencias de ácido nucleico que codifican tres secuencias de aminoácidos de la molécula de proteína o al menos una parte de la misma.

Preferiblemente uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina, otro dicho ácido nucleico codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a neomicina, y un otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1.

En una realización incluso más preferida uno de dichos ácidos nucleicos codifica adicionalmente para el elemento genético que codifica resistencia a puromicina o neomicina y el otro dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1. En una realización incluso más preferida uno de dichos ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera y comprende además a una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, lo más preferiblemente secuencia #1, y el otro dicho ácido nucleico comprende secuencias que codifican el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes, de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo y comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una resistencia a puromicina o neomicina, preferiblemente resistencia a puromicina.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende al menos una secuencia que codifica el dominio variable y el dominio constante de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo y al menos una secuencia que codifica el dominio variable y al menos un dominio constante, preferiblemente todos los dominios constantes de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo.

En una realización preferida de la invención los dominios constantes codificados por ácidos nucleicos anteriores o descritos en otras partes son dominios constantes humanos de IgG o IgM, preferiblemente IgG1, IgG4 o IgM humanos, o un dominio o una combinación de dominios de los mismos, por lo cual preferiblemente se usan secuencias genómicas o secuencias derivadas de secuencias genómicas que comprenden al menos un intrón, que se pueden ser seleccionados, construidos y optimizados por los expertos en la técnica.

En una realización preferida adicional de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además el promotor EF-1alfa / potenciador CMV o un promotor derivado del promotor CMV, preferiblemente CMV-E.

En una realización preferida adicional de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además un péptido de señales de secreción, preferiblemente la señal de secreción del receptor de linfocitos T.

En una realización incluso más preferida de la invención dicho ácido nucleico que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma comprende además un péptido de señales de secreción, preferiblemente la secuencia #10.

Dicho ácido nucleico o combinación de ácidos nucleicos que codifica una proteína, que es preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, así como dichos elementos genéticos adicionales, así como los métodos para introducirlos son conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos para construir, identificar, probar, optimizar, seleccionar y combinar estos ácidos o ácidos nucleicos y combinarlos con secuencias adicionales adecuadas para la selección de aquellas células que están transfectadas con éxito, así como métodos para construir, identificar, probar y seleccionar los ácidos nucleicos más adecuados que codifican estas moléculas de anticuerpos son conocidos por los expertos en la técnica.

Se describen en detalle realizaciones preferidas de la invención en los ejemplos.

La introducción del ácido nucleico puede ser transiente o bien estable.

De acuerdo con la presente invención el término amplificar la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma cultivando dicha célula huésped con un antifolato, en particular metotrexato significa que una célula huésped de la invención descrita en otras partes de la presente memoria en la que al menos un ácido nucleico que codifica la proteína a ser expresada tal como p.ej. una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma, y al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de DHFR resistente al antifolato, preferiblemente al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, se introdujo y se cultiva mediante al menos una concentración de antifolato, preferiblemente metotrexato. Un tiempo de cultivo típico es entre una y dos semanas para cada ronda, a concentraciones típicas de aproximadamente 20 nM a 3.000 nM,

preferiblemente entre aproximadamente 50 nM y 2.000 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 100 nM y 2.000 nM. La duración de un tratamiento de amplificación de antifolato/metotrexato, así como la concentración y los correspondientes vectores de ácidos nucleicos pueden ser optimizadas por los expertos en la técnica, y también se describe en una realización preferida en los ejemplos. Las condiciones de amplificación óptimas pueden diferir entre diferentes moléculas de proteína/anticuerpo codificadas y la utilización de diferentes ácidos nucleicos o constructos de ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos descritas anteriormente. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones y ácidos nucleicos más adecuados. Dicha amplificación conduce a una integración de más copias de ácidos nucleicos que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma en el genoma de la célula huésped que sin cultivo con antifolato/metotrexato o que sin la introducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una variante de DHFR resistente al antifolato, en particular un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 y/o conduce a una producción aumentada de la composición molecular de proteína/anticuerpo.

En una realización preferida de la invención dicha célula huésped para amplificación del ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma, que fue introducida en dicha célula huésped en la que al menos un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1, fue introducido, como se describe en otras partes de la presente memoria incluyendo sus realizaciones preferidas, son de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente la célula o línea celular KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, más preferiblemente la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, e incluso más preferiblemente la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped.

En una realización preferida de la invención dicha célula huésped se cultiva con al menos dos rondas sucesivas de antifolato/metotrexato, por lo que la concentración de antifolato/metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva. En una realización incluso más preferida de la invención dicha célula huésped se cultiva con al menos tres, más preferiblemente con cuatro, más preferiblemente con 5, e incluso más preferiblemente con 6 rondas sucesivas de antifolato/metotrexato, por lo cual la concentración de antifolato/metotrexato es aumentada preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva. Incluso más preferidas son concentraciones de antifolato/metotrexato entre aproximadamente 20 nM y 3.000 nM, más preferidas entre aproximadamente 50 nM y 2.000 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 100 nM y 2.000 nM, e incluso más preferidas de aproximadamente 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1.000 nM, 2.000 nM, que en la realización preferida se usan en rondas sucesivas que se inician a partir de 100 nM.

Es sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de DHFR resistente al antifolato y preferiblemente al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 permite la amplificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped de origen leucémico mieloide humano, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo con antifolato/metotrexato.

Es especialmente sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido de secuencia #1 permite la amplificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo con metotrexato.

Es incluso más sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9 permite una amplificación incluso adicional de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo de dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato por lo que la concentración de metotrexato es aumentada en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva.

Es incluso más sorprendente que la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 permite una amplificación incluso adicional de la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicha molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma en la célula huésped, y especialmente en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-

H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, por cultivo de dicha célula huésped con al menos dos rondas sucesivas de metotrexato por lo que la concentración de metotrexato es aumentada en al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 100%, en cada ronda sucesiva.

En una realización preferida, el término que la amplificación es estable significa que conduce a la producción de altos rendimientos de la composición molecular de anticuerpo sobre al menos 35 generaciones de ciclos de división de la célula huésped. La amplificación de dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos introducidos de manera estable que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o fracción de la misma puede ser realizada como se describe anteriormente y en los ejemplos usando metotrexato.

Se describen realizaciones preferidas adicionales en los ejemplos.

En una realización preferida de la invención la célula huésped con ácidos nucleicos introducidos se usa preferiblemente después de al menos una ronda de clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo. Preferiblemente dicha clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo ocurre después de al menos una ronda de amplificación con metotrexato descrita en otras partes de la presente memoria. En una realización preferida adicional, dichos clones celulares son amplificados adicionalmente por al menos una ronda adicional de amplificación con metotrexato, preferiblemente una concentración aumentada de metotrexato, preferiblemente al menos la concentración doble de metotrexato, e incluso más preferido seguido de una ronda adicional de clonación celular única y selección de los clones celulares con expresión adecuada y secreción de dicha composición de proteína/anticuerpo.

Con estas realizaciones preferidas se pueden seleccionar clones celulares con rendimientos de expresión particularmente altos.

De acuerdo con la presente invención el término cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo o una formulación respectiva para proteínas en general significa que la célula huésped de la invención que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo, preferiblemente las realizaciones preferidas de dicho ácido nucleico descritas en otras partes de la presente memoria, se cultiva en condiciones de cultivo que permiten la expresión de la molécula de proteína/anticuerpo en forma de una composición molecular de proteína/anticuerpo, preferiblemente la secreción en el medio, preferiblemente con altos rendimientos y/o alta actividad y/o alta homogeneidad como se describe en otras partes de la presente memoria. Los expertos en la técnica pueden seleccionar las condiciones de cultivo más adecuadas usando medios adecuados y condiciones de cultivo tales como, pero no limitadas a, tiempo adecuado, temperatura, pH, gasificación, alimentación, medio, suplementos del medio, tamaños de recipiente o reactor y principios conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones más adecuadas. Se describen realizaciones preferidas en los ejemplos, pero no se limitan a estos.

El cultivo de las células de la presente invención se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos de cultivo generales para células animales capaces de producir eficazmente la composición molecular de anticuerpo deseada, por ejemplo, cultivo por lotes, cultivo por lotes repetidos, cultivo por lote alimentado y cultivo por perfusión. Preferiblemente, se emplea cultivo por lote alimentado o cultivo por perfusión, a fin de elevar la productividad de los polipéptidos deseados.

En una realización preferida adicional de la invención dicho cultivo se realiza en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido con medios exentos de proteínas o medios exentos de componentes animales.

La adaptación de las células huésped de la presente invención a un medio exento de suero de acuerdo con la presente invención es sorprendentemente rápida y robusta. La adaptación se puede llevar a cabo, por ejemplo, adaptando células subcultivadas en un medio que contiene suero directamente a un medio exento de suero disponible en el mercado, o por adaptación continua, en donde la adaptación directa a medio exento de suero es preferida y ventajosa. Durante el proceso de adaptación a un medio exento de suero, la viabilidad de las células disminuye temporalmente, lo que causa a veces la extinción de las células. Por lo tanto, se prefiere inocular las células en un medio para la adaptación a un medio exento de suero a una densidad celular de 1 x 10<5> a 5 x 10<5> células/ml, preferiblemente 2 x 10<5> células/ml, a fin de restaurar la viabilidad de las células o mantenerla alta. Después de 4 a 7 días de cultivo, las células cuya densidad alcanzó 5 x 10<5> a 10 x 10<5> células/ml se seleccionan como las células adaptadas a un medio exento de suero. La adaptación a un medio exento de suero también se puede realizar por dilución sucesiva del medio suplementado con FCS mediante una composición de medio exento de suero (adaptación continua). Los expertos en la técnica pueden seleccionar y optimizar las condiciones más adecuadas. Se describen realizaciones preferidas en los ejemplos, pero no se limitan a estos.

Después de que las células de la presente invención se han adaptado a un medio exento de suero, se puede preparar una línea celular clonada usando el método de dilución limitante con una placa de 96 pocillos, el método formador de colonias, o similares, y se seleccionan las células o línea celular en base a las propiedades de esas células que son ventajosas en comparación con su célula o línea celular parental, tales como, pero no limitadas a,

tiempos de doblado más cortos, crecimiento más rápido, posibilidad de crecer bajo densidades más altas, pueden producir más, eficacias de clonación más altas, eficacias de transfección más altas para ADN, tasas de expresión más altas de composiciones moleculares de anticuerpos, actividades más altas para una composición molecular de anticuerpo expresada en las mismas, y/o robustez más alta para aumentar a escala. Los métodos para seleccionar la célula con propiedades ventajosas son conocidos por los expertos en la técnica o descritos en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención la expresión aislar dicha composición molecular de anticuerpo o una formulación correspondiente para proteínas significa en general que la composición molecular de proteína/anticuerpo expresada por dicha célula huésped que comprende al menos uno de dichos ácidos nucleicos que codifican la molécula de proteína/anticuerpo o fracción de la misma descrita en otras partes de la presente memoria se obtiene usando los medios de cultivo después de cultivar o enriquecer o purificar adicionalmente la composición molecular de proteína/anticuerpo o partes de dicha composición molecular de proteína/anticuerpo por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dicha composición molecular de proteína/anticuerpo, en el sentido de la invención, también significa partes de dicha composición molecular de proteína/anticuerpo enriquecidas para ciertas moléculas de proteína/anticuerpo descritas en otras partes de la presente memoria.

En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada separando el medio, después del cultivo, de las células y/o el residuo celular, por ejemplo por técnicas de centrifugación.

En una realización preferida adicional de la invención una composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada o enriquecida adicionalmente por ultrafiltración, métodos de precipitación y otros métodos de concentración conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida adicional de la invención una composición molecular de proteína/anticuerpo es aislada por purificación de la composición molecular de proteína/anticuerpo por métodos cromatográficos, tales como, pero no limitados a, cromatografía de afinidad usando materiales de afinidad acordes, tales como, pero no limitados a, Proteína A, Proteína G, anticuerpos de isotipo anti-anticuerpo, cromatografía con lectina, anticuerpos contra una cierta etiqueta introducida en la molécula de anticuerpo tal como HIS-tag o myc-tag, o antígeno, o por cromatografía de intercambio iónico, conocida por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para purificar o enriquecer proteínas o ciertas glicoformas de proteínas, y pueden ser seleccionados, adoptados, optimizados y usados solos o en combinación con métodos descritos anteriormente por los expertos en la técnica para aislar o purificar adicionalmente, fraccionar o enriquecer la composición molecular de proteína o fracciones de la misma.

En una realización preferida de la invención, una composición molecular de anticuerpo de la invención de principalmente IgG es aislada mediante cromatografía con Proteína A con o sin ultracentrifugación previa.

En otra realización preferida de la invención una composición molecular de anticuerpo de la invención de principalmente IgM es aislada mediante cromatografía con anticuerpo anti-IgM con o sin ultracentrifugación previa.

En otra realización preferida de la invención, una composición molecular de anticuerpo de la invención enriquecida en ciertas glicoformas de la molécula de anticuerpo es aislada por cromatografía de afinidad con lectina con o sin ultracentrifugación previa. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para purificar o enriquecer proteínas o ciertas glicoformas de proteínas, y pueden ser seleccionados, adoptados, optimizados y usados solos o en combinación con métodos descritos anteriormente por los expertos en la técnica para aislar o purificar adicionalmente, fraccionar o enriquecer la composición molecular de proteína o fracciones de la misma.

En una realización preferida la composición molecular de anticuerpo es aislada usando columnas de Proteína A. En otra realización preferida la composición molecular de anticuerpo es aislada usando una columna anti-IgM.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "actividad aumentada" significa que la actividad de una composición molecular de proteína y/o anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína y/o anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón. En la realización preferida de la invención significa que la actividad de una composición molecular de proteína y/o anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína y/o anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. Para anticuerpos, dicha actividad aumentada es una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada o una actividad de unión aumentada.

En el significado de la invención, "actividad" es también una función o conjunto de funciones realizadas por una molécula de proteína en un contexto biológico. En el significado de la invención, la expresión "actividad aumentada", equivalentes de los contenidos y equivalentes gramaticales de la misma son para entender como una actividad mejorada u óptima con respecto a la aplicación seleccionada, por lo que la actividad podría ser aproximada a un valor limitante, por ejemplo ser minimizada o maximizada, o bien ajustada a un valor medio que representa una

actividad más alta o más baja en comparación con la molécula de proteína correspondiente producida por la técnica anterior. Actividad mejorada o aumentada en el sentido de la invención también significa una actividad favorable en el sentido de su significado biológico y/o farmacéutico como semivida en suero mejorada, farmacocinética, estabilidad, actividad biológica, unión, antigenicidad y/o inmunogenicidad. Por ejemplo, la actividad biológica de una composición molecular de proteína podría ser aumentada hasta cierto punto disminuyendo efectos biológicos adversos, p.ej. por la estimulación reducida de efectos inmunes adversos o una inmunogenicidad disminuida.

La actividad de la composición molecular de proteína puede ser determinada en un bioensayo adecuado que sea capaz de determinar la actividad de la proteína. Los expertos en la técnica pueden identificar bioensayos adecuados o construir bioensayos adecuados. Según la presente invención tales bioensayos incluyen por ejemplo ensayos biológicos in vitro, que incluyen ensayos celulares o moleculares o mixtos, tales como ensayos de proliferación, ensayos de apóptosis, ensayos de adhesión celular, ensayos de señalización, ensayos de migración, ensayos de citotoxicidad celular, ensayos de fagocitosis, ensayos de lisis, y ensayos de unión. Tales bioensayos también incluyen ensayos in vivo que usan modelos animales o humanos, tales como biodistribución, ensayo farmacocinético, farmacodinámico, ensayos de semivida en suero, ensayos para biodisponibilidad, ensayo de eficacia, ensayos de localización, ensayos de tratamiento y profilaxis de enfermedades, incluyendo estudios clínicos. Tales bioensayos también incluyen ensayos químicos, físicos, fisicoquímicos, biofísicos y bioquímicos, tales como estabilidad a la temperatura, tensión de cizallamiento, presión, pH, conjugación y otros. Tales bioensayos también incluyen ensayos para la inmunogenicidad y/o antigenicidad para mejorar las propiedades de la composición molecular de proteína con respecto a su uso clínico. Los expertos en la técnica pueden determinar la actividad o una combinación de actividades descritas de composiciones moleculares de proteína.

En una realización preferida la actividad más alta de la composición molecular de proteína se caracteriza por una actividad más alta en al menos un modelo in vitro y/o una actividad más alta en al menos un modelo in vivo y/o una estabilidad más alta y/o una semivida en suero más larga y/o una biodisponibilidad más larga y/o una inmunogenicidad mejorada y/o una antigenicidad mejorada determinadas por al menos un bioensayo. La mejora en la actividad global, que también se llama en la presente memoria actividad más alta, puede conducir por ejemplo a mejoras como dosificaciones más bajas, intervalos de tiempo más largos para la administración, menos efectos secundarios y ninguna o más baja toxicidad del producto cuando se usa en seres humanos u organismos acordes dando como resultado productos farmacéuticos mejorados en gran medida.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína producida por la técnica anterior.

Dicha citotoxicidad celular mediada por Fc es una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada (actividad ADCC), actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (actividad CDC), y/o citotoxicidad causada por fagocitosis (actividad de fagocitosis). La citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, incluyendo actividad ADCC, actividad CDC o actividad de fagocitosis, puede ser determinada por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, y algunos se describen en detalle en los ejemplos sin limitarla a esos métodos, por lo que los métodos descritos en los ejemplos son realizaciones preferidas de la invención.

Dicha actividad de unión aumentada es una unión aumentada al epítopo de la molécula de anticuerpo, tal como el epítopo, el antígeno, otro polipéptido que comprende el epítopo, o una célula que comprende el epítopo de la molécula de anticuerpo, o una unión aumentada al menos a un receptor Fc u otro ligando efector, tal como Fc-gammaRI, Fc-gammaRII, Fc-gammaRII, y subclases de los mismos tales como Fc-gammaRIIa, Fc-gammaRIIIa, Fc-gammaRIIIb, o el componente Cq1 del complemento, o FcRn o una molécula o célula que comprende cualquiera de estos receptores Fc o ligandos efectores. La actividad de unión aumentada puede ser una afinidad más alta, una avidez más alta, y/o un número más alto de sitios de unión o combinaciones de los mismos. La actividad de unión aumentada puede dar como resultado diversos efectos y actividades, tales como, pero no limitados a, formas de actividad mediada por receptor como se describen en los antecedentes de la técnica. La afinidad de unión, avidez y actividad mediada por receptor más altas pueden ser determinadas por al menos uno de los diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como, pero no limitados a, medición con Biacore, análisis de Scatchard, medidas basadas en ELISA o RIA, medidas de citometría de flujo, ensayo para determinar la inducción de apóptosis en células diana adecuadas, ensayos para la determinación de la proliferación de células diana adecuadas, ensayos para el bloqueo antagonístico, agonístico o de receptor de una composición molecular de anticuerpo tales como, pero no limitados a, inhibición de unión mediada por célula-célula, desencadenamiento de eventos moleculares internos celulares. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y/o adoptar y/o modificar un método adecuado o combinación de métodos para ensayar la afinidad de unión, avidez, número de sitios de unión y/o actividad mediada por receptor.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para ensayar la capacidad de un anticuerpo para poder obtener una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, preferiblemente actividad ADCC, actividad CDC y/o citotoxicidad causada por fagocitosis, y/o una actividad de unión aumentada al epítopo de la molécula de anticuerpo o preferiblemente al a menos un receptor Fc u otro ligando efector, en general y/o en particular con las células huésped de la invención y sus realizaciones preferidas descritas en otras partes de la presente memoria.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alta que la actividad de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en la misma.

En una realización preferida de la invención la actividad de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es al menos 50% más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 23 veces, más preferiblemente al menos 30 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, más preferiblemente al menos 75 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 150 veces, más preferiblemente al menos 150 veces, más preferiblemente al menos 230 veces, más preferiblemente al menos 300 veces, más preferiblemente al menos 500 veces, más preferiblemente al menos 750 veces, y lo más preferiblemente al menos 1.000 veces.

De este modo, no cada bioensayo tiene que mostrar una actividad más alta, pero dependiendo del uso y los rasgos de una composición molecular de proteína particular, algunos efectos biológicos favorables pueden compensar otros que son menos favorables y dar aún como resultado una actividad global más alta de la composición molecular de proteína en el sentido de la invención. Por ejemplo, una cierta composición molecular de proteína puede dar como resultado una actividad mucho más alta al unirse a sus receptores de células, desencadenando de este modo un efecto secundario, tal como inducción de proliferación, pero mostrar una semivida en suero ligeramente disminuida. En combinación, la actividad más alta que desencadena más el receptor compensa entonces la biodisponibilidad más corta en la bioactividad global. En otro ejemplo, una semivida más corta y una actividad más alta hacia el receptor que se desencadena son ambas ventajosas. En aún otro ejemplo la actividad in vivo no es mejorada pero la estabilidad in vitro mejora la producción y almacenamiento de la composición molecular de proteína. En aún otro ejemplo, se necesita una semivida larga pero una actividad más baja.

En una realización preferida de la invención la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una CDC aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una citotoxicidad aumentada causada por fagocitosis. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad de unión al epítopo aumentada. En otra realización preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada, preferiblemente FcγRIIIA. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada y una actividad de unión al epítopo aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada y una actividad de unión al epítopo aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada, una actividad CDC aumentada, una actividad de unión al epítopo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada. En una realización preferida adicional la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una actividad ADCC aumentada, citotoxicidad causada por fagocitosis aumentada, una actividad de unión al epítopo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada. En la realización más preferida la actividad aumentada de una composición molecular de anticuerpo es una ADCC aumentada, citotoxicidad aumentada causada por fagocitosis, una actividad CDC aumentada y una actividad de unión al epítopo aumentada y una actividad de unión al menos a un receptor Fc aumentada.

De acuerdo con la presente invención, el término “homogeneidad mejorada” significa que una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención comprende menos glicoformas diferentes, o más de una glicoforma favorable o de glicoformas favorables, o menos de al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo (preferiblemente en aquellas glicoformas que representan al menos 1% de la composición molecular de anticuerpo total en sí misma) que al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida de la invención, significa que una composición molecular de anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención comprende menos glicoformas diferentes, o más de una glicoforma favorable o de glicoformas favorables, o menos de al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo que una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma.

Una heterogeneidad particularmente problemática para la producción y uso en el ser humano es la sialilación. En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo de la invención tiene una homogeneidad mejorada al no comprender glicoforma con el ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), por lo cual en este caso sin glicoforma significa ninguna glicoforma de más que 1% de todas las cadenas de carbohidratos obtenibles

de la composición molecular de anticuerpo purificada y más preferiblemente sin cadena de carbohidrato detectable en absoluto como es detectable por los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dado que se sabe que NeuGc puede ser inmunogénico en seres humanos, esta es una gran ventaja de las células huésped de la invención sobre otros sistemas de producción tales como CHO, NSO, SP2/0.

En una realización preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo tiene una homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación por comprender menos que 5% de glicoformas, más preferiblemente menos que 3%, incluso más preferiblemente menos que 1%, y lo más preferiblemente ninguna glicoforma de la composición molecular de proteína/anticuerpo con ácido siálico detectable como se describe en los ejemplos. En una realización preferida adicional se consigue una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un defecto en la ruta de precursores de nucleótidos de azúcar y por lo tanto es deficiente para o tiene CMP-ácido siálico reducido, lo que da como resultado ninguna sialilación o reducida en gran medida de las cadenas de azúcar carbohidratos de las moléculas de proteína/anticuerpo cuando las células son cultivadas en un medio exento de suero. En una realización incluso más preferida tal composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación puede ser conseguida usando NM-F9 [DSM ACC2606] o NM-D4 [DSM ACC2605] como una célula huésped de la invención cultivada en un medio exento de suero como se describe en más detalle en los ejemplos.

En otra realización preferida adicional una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un defecto en el transportador de nucleótidos de azúcar de GMP-ácido siálico o en al menos una sialiltransferasa, lo que da como resultado ninguna sialilación o reducida en gran medida de las cadenas de azúcar carbohidrato de las moléculas de proteína/anticuerpo cuando las células son cultivadas en un medio exento de suero. Son ejemplos NM-F9, NM-D4 y GT-2X.

En otra realización preferida adicional una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano de la invención que tiene un grado de sialilación aumentado. Dicho grado de sialilación significa que la cantidad del ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc o NeuNAc) en las moléculas de proteína/anticuerpo en una composición molecular de proteína/anticuerpo es al menos 5%, más preferiblemente al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 25 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, y lo más preferiblemente al menos 100 veces, más alta que la cantidad del ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc o NeuNAc) de las unidades carbohidrato totales o la cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína/anticuerpo cuando se comparan con la misma cantidad de moléculas de proteína/anticuerpo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas. El grado de sialilación puede ser detectado por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como, pero no limitados a, análisis inmunoblot o ELISA usando lectinas cuya unión depende de la sialilación de la estructura de carbohidrato, tales como SNA, MAL, MAL I o PNA, por métodos de detección química tales como el método del ácido tiobarbitúrico, por HPLC o espectrometría de masas o combinación de los mismos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar el método más adecuado y adoptarlo y optimizarlo para este fin, y se describen más detalles en los ejemplos. Se prefiere un análisis inmunoblot usando SNA.

En otra realización preferida adicional se consigue una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas, y lo más preferiblemente K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X que tiene un grado de sialilación aumentado, y da como resultado una composición molecular de proteína/anticuerpo que comprende ácido siálico enlazado en alfa 2-6, detectable por ejemplo por unión a SNA, en una versión más preferida la composición molecular de proteína/anticuerpo comprende ácidos siálicos enlazados en alfa 2-6 y alfa 2-3.

En otra realización preferida se consigue una composición molecular de proteína/anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación usando una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir NeuNAc en enlace alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir NeuNAc en alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como, pero no limitadas a, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas, dando como resultado una composición más preferida de glicoformas de la molécula de proteína/anticuerpo en la composición molecular de proteína/anticuerpo.

En una realización incluso más preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo de la invención

con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación comprende al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo con al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio (dominio Cgamma2) de la región Fc.

En una realización incluso más preferida de la invención la anterior composición molecular de anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación se expresa en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que tiene un grado de sialilación aumentado y/o comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en enlace alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X y células o líneas celulares derivadas de las mismas.

En una realización incluso más preferida la anterior molécula de anticuerpo tiene al menos un sitio de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro) y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab.

En una realización preferida adicional la composición molecular de anticuerpo de la invención con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación que comprende una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo distinto al aminoácido Asn-297 en el segundo dominio (dominio Cgamma2) de la parte Fc tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas, o preferiblemente en seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, NM-F9, NM-D4 o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas.

La biodisponibilidad de los anticuerpos puede ser optimizada usando la presente invención. La expresión de moléculas de anticuerpo en particular en células que tienen una alta o incluso una sialilación muy alta (grupos 1 y 3 discutidos anteriormente) puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad prolongada, mientras que la expresión de moléculas de anticuerpo en las células del grupo 2 puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad prolongada, mientras que la expresión de moléculas de anticuerpo en las células del grupo 2 puede conducir a una composición de anticuerpo con una biodisponibilidad comparablemente acortada. La biodisponibilidad puede ser ensayada como conocen los expertos en la técnica, y como se describe en los ejemplos usando animales o preferiblemente seres humanos. Los animales incluyen ratones, ratas, conejillos de indias, perros o monos, pero no están restringidos a esas especies. Debido a la naturaleza humana se prefieren aquellos animales que tienen una glicosilación y de manera más importante sialilación más cercana a la humana, lo más preferido son seres humanos.

En una realización incluso más preferida la composición molecular de anticuerpo con homogeneidad mejorada con respecto a la sialilación se expresa en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano que tiene un grado de sialilación aumentado y/o comprende al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en alfa 2-3 y al menos una sialiltransferasa capaz de unir ácido siálico en enlace alfa 2-6 a grupos de azúcar, tales como K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, y células o líneas celulares derivadas de las mismas, y comprenden al menos una cadena de carbohidrato unida al menos a un sitio de N-glicosilación y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab de la molécula de anticuerpo, y tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas, o preferiblemente en seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en las mismas. En una realización preferida adicional la molécula de anticuerpo expresada es Erbitux (Cetuximab).

De acuerdo con la presente invención la expresión "rendimiento aumentado" significa que el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo producida en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alto que el rendimiento medio o máximo respectivo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón. En la realización preferida de la invención significa que el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano es más alto que el rendimiento medio o máximo respectivo de una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usando el gen murino dhfr y metotrexato para la amplificación en CHOdhfr-. El rendimiento medio y máximo se mide en SPR, que refleja la productividad de una célula, mezcla celular o una línea celular, puede ser determinado por los expertos en la técnica, y se describe en su realización preferida en los ejemplos.

En una realización preferida adicional de la invención al menos el rendimiento medio o máximo de una composición molecular de proteína/anticuerpo expresada en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, preferiblemente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas, es al menos 10% más alto

que el correspondiente de la composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo cuando se expresa en CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usando el gen murino dhfr y metotrexato para la amplificación en CHOdhfr-, más preferiblemente al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, más preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, y lo más preferiblemente más que 5 veces.

Además se describe un ácido nucleico, que comprende

(a) una secuencia que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y

(b) al menos una secuencia que codifica una secuencia del grupo de secuencia #1 a secuencia #9.

En una realización preferida el ácido nucleico comprende

(a) una secuencia que codifica una proteína, preferiblemente una molécula de anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y

(b) una secuencia que codifica la secuencia #1.

En una realización preferida adicional el ácido nucleico descrito anteriormente comprende además una secuencia que codifica un marcador de selección, preferiblemente una secuencia que codifica para un polipéptido que induce una resistencia a antibióticos de una célula huésped en la que dicho ácido nucleico es introducido, tal como, pero no limitado a, neomicina o puromicina.

En una realización preferida adicional el ácido nucleico descrito anteriormente comprende además al menos una secuencia de al menos un elemento genético descrito en otras partes de la presente memoria.

También se divulga una célula sanguínea humana inmortalizada de origen leucémico mieloide humano capaz de producir una composición molecular de anticuerpo que tiene las siguientes características de glicosilación:

(i) no comprende NeuGc detectable;

(ii) comprende NeuNAc enlazado en α2-6;

(iii) tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular del anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y

(iv) comprende al menos 50% de estructuras de carbohidrato de las unidades de carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo, que carecen de fucosa;

en donde el anticuerpo es un anticuerpo entero terapéutico.

La invención proporciona además una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en GT-2X [DSM ACC2858], NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807], NM-H9D8-E5Q12 [DSM ACC 2856], o una célula o línea celular derivada de las mismas; en donde la célula o línea celular derivada de DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6) o DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) es capaz de producir una composición de molécula proteica que

- no comprende NeuGc detectable;
- comprende NeuNAc enlazado en α2,6; y
- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula proteica de las moléculas proteicas en dicha composición de molécula proteica que es al menos 15% mayor en comparación con la misma cantidad de moléculas proteicas en al menos una composición de molécula proteica de la misma molécula proteica aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

Una célula huésped se puede seleccionar de una célula huésped de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano o una mezcla

de células o líneas celulares que comprende al menos una célula huésped de origen leucémico mieloide humano, o célula, células o línea celular que fue obtenida fusionando al menos una célula, células o una línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano, con otra célula de origen humano o animal, tal como, pero no limitada a, linfocitos V, células CHO, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma que fue introducido en dichas células.

Una célula huésped descrita anteriormente puede comprender al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma.

Una célula huésped se puede seleccionar de la célula huésped K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, preferiblemente aquellas que crecen en condiciones exentas de suero y de las que se aísla una composición molecular de proteína/anticuerpo en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo fue introducido en condiciones exentas de suero, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria.

Una célula huésped descrita anteriormente puede comprender al menos un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1.

Una célula huésped se puede seleccionar de la célula huésped K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, preferiblemente aquellas que crecen en condiciones exentas de suero y de las que se aísla una composición molecular de proteína/anticuerpo en condiciones exentas de suero, e incluso más preferido aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo fue introducido en condiciones exentas de suero, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o partes de la misma, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una molécula de proteína/anticuerpo o al menos una parte de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, y al menos una secuencia que codifica una secuencia del grupo de secuencia #1 a secuencia #9, preferiblemente secuencia #1.

En las células huésped descritas anteriormente la molécula de anticuerpo codificada puede ser un anticuerpo del documento de patente WO2004/065423.

En las células huésped descritas anteriormente la molécula de anticuerpo codificada puede ser el anticuerpo PankoMab [Cancer immunol. Immunother. 2006 Nov;55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], preferiblemente una forma quimérica de PankoMab con todos los dominios constantes humanos, y más preferiblemente un PankoMab humanizado.

La invención proporciona además una composición molecular de anticuerpo obtenible por un método de producción que comprende las etapas de

(a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicho anticuerpo; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo; y

(c) aislar dicha composición molecular de anticuerpo;

en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807] y NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856]; y

en donde la composición molecular de anticuerpo

- no comprende NeuGc detectable;

- comprende NeuNAc enlazado en α2-6; y

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma; y

en donde el anticuerpo es un anticuerpo entero terapéutico.

Una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana puede ser producida por cualquiera de los métodos de la invención descritos en alguna parte de la presente memoria.

En una realización preferida una composición molecular de proteína/anticuerpo producida por cualquiera de los métodos de la invención tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana producida por cualquiera de los métodos de la invención cuando se compara con una composición molecular de proteína/anticuerpo de la misma molécula de proteína/anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, o CHOdhfr-, o BHK, o NS0, o SP2/0, o PerC.6 o hibridoma de ratón, preferiblemente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], cuando se expresa en las mismas.

La molécula de proteína o parte de la misma expresada puede ser cualquier proteína o parte de proteína o fragmento de proteína. La molécula de anticuerpo o parte de la misma expresada puede ser cualquier anticuerpo o parte de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Las composiciones moleculares de proteína se pueden usar para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades, tales como leucemia, neutropenia, citopenia, cáncer, transplante de médula ósea, enfermedades de sistemas hematopoyéticos, infertilidad y enfermedades autoinmunes. El espectro de aplicaciones terapéuticas conocidas por las personas del campo de la técnica de las composiciones moleculares de proteína es muy amplio. Por ejemplo, G-CSF es un importante terapéutico para tratar la neutropenia, una disminución de los neutrófilos peligrosa para la vida como consecuencia de una quimioterapia de pacientes de cáncer leucémico. GM-CSF se usa específicamente para el tratamiento de pacientes de AML en edad relativamente alta después de quimioterapia para conseguir una rápida recuperación de la neutropenia. GM-CSF está adicionalmente aprobado como terapéutico para varias aplicaciones en transplantes de médula ósea y para inmovilización de células madre sanguíneas periféricas. Además, hay varias aplicaciones clínicas de GM-CSF que están actualmente en investigación, tal como para el tratamiento de HIV y cáncer. Ciertas enfermedades del sistema hemtopoyético se tratan con EPO, y IFN-beta es actualmente un importante terapéutico para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune. Otro ejemplo es FSH, que se usa ampliamente para el tratamiento de la infertilidad masculina y femenina. La hCG también se aplica para el tratamiento de la infertilidad, pero centrándose en la anovulación en las mujeres. hGH tiene beneficios probados clínicamente, tales como reducción de la grasa corporal y aumento del tejido muscular.

Las composiciones moleculares de proteína también se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades seleccionadas del grupo que comprende leucemia, neutropenia, citopenia, cáncer, transplante de médula ósea, enfermedades de sistemas hematopoyéticos, infertilidad y enfermedades autoinmunes.

En una realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo expresada es una molécula de anticuerpo que reconoce psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedades autoinmunes, SLE, esclerosis múltiple, trastornos hematológicos autoinmunes, asma, alergia, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de aloinjertos, cirugía de glaucoma, infarto de miocardio, virus tales como RSV, HIV, Hep B, o CMV, cáncer, sarcoma, CLL, AML o NHL.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo expresada es una molécula de anticuerpo que reconoce el cáncer, tumor o metástasis, al menos una célula de cáncer o célula de tumor, en al menos un ser humano, seleccionado preferiblemente del grupo de enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales de la región oído-nariz-garganta, de los pulmones, mediastino, sarcomas, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas del sistema nervioso central, enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales durante la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tumor primario desconocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneales, malignidades relacionadas con inmunosupresión y/o metástasis de tumor.

En una realización preferida de la invención la molécula de anticuerpo o parte de la misma es un anticuerpo anti MUC1.

En una realización preferida adicional de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es el anticuerpo Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1 H o anticuerpos derivados de los mismos.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo del documento de patente WO2004/05070 e incluso más preferida del documento de patente WO2004/065423, e incluso más preferido PankoMab [Cancer immunol. Immunother. 2006 Nov;55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], e incluso más preferido una forma quimérica del mismo con todos los dominios constantes humanos, e incluso más preferido un anticuerpo humanizado del mismo.

En una realización aún más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero de la invención, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, más

preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, en donde la composición molecular de anticuerpo aislada de cualquier célula huésped de la invención, según la reivindicación 19 NM-H9D8, o NM-H9D8-E6 o NM-H9D8-E6Q12, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, no comprende NeuGc detectable.

En una realización aún más preferida la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero o una molécula de anticuerpo que comprende el dominio Cgamma2, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, en donde la composición molecular de anticuerpo aislada de cualquier célula huésped de la invención, según la reivindicación 19 NM-H9D8, o NM-H9D8-E6 o NM-H9D8-E6Q12, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, comprende al menos una glicoforma con ácido alfa 2-6 siálico.

En una realización aún más preferida la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es cualquier anticuerpo entero o una molécula de anticuerpo que comprende el dominio Cgamma2, preferiblemente Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1 H, más preferiblemente WO2004/065423, lo más preferiblemente PankoMab, en donde la composición molecular de anticuerpo aislada de cualquier célula huésped de la invención, según la reivindicación 19 NM-H9D8, o NM-H9D8-E6 o NM-H9D8-E6Q12, o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped, comprende ácido alfa 2-6 siálico, que es detectable por análisis inmunoblot con la lectina SNA como se describe en los ejemplos. Lo mismo se aplica a proteínas en general.

En una realización preferida adicional de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es el anticuerpo Rituximab, Herceptin, Erbitux, Campath 1H, o anticuerpos derivados de los mismos, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una actividad CDC aumentada de al menos 4 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En una realización aún más preferida la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo de la solicitud de patente internacional WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una actividad CDC aumentada de al menos 4 veces más alta cuando se produce en al menos una de las células NM-H9D8, H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En otra realización preferida la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo del documento de patente WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped NM-H9D8, H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 o una célula o línea celular derivada de una cualquiera de dichas células huésped tiene una actividad de unión a su epítopo aumentada de al menos 50% más alta, preferiblemente 2 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En otra realización preferida la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo del documento de patente WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, y la composición molecular de anticuerpo aislada de la célula huésped tiene una homogeneidad mejorada como se describe anteriormente, y una actividad ADCC aumentada de al menos 4 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

En la realización más preferida de la invención la molécula de anticuerpo codificada por el ácido nucleico o ácidos nucleicos es un anticuerpo del documento de patent WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab.

Se puede usar una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención descrito en otras partes de la presente memoria, en donde la célula huésped es cualquier célula, células, o línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide humana que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser obtenida de un donante humano o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una célula de origen leucémico mieloide humano, o una célula o línea celular derivada de la misma como se describe en otras partes de la presente memoria, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una de esas células mencionadas anteriormente. Las células huésped de la invención se definen en las reivindicaciones.

Se puede usar una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención descrito en otras partes de la presente memoria, en donde la célula huésped es cualquier célula, células, o línea celular que se obtuvo fusionando al menos una célula, células, o línea celular de origen leucémico mieloide humano o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide humana que puede ser obtenida de un paciente de leucemia, o cualquier célula o línea celular mieloide o precursora mieloide que puede ser

obtenida de un donante humano, con otra célula de origen humano o animal, tales como, pero no limitadas a, linfocitos B, células CHO.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenden al menos una de esas células mencionadas anteriormente.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM- H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM- H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero, y preferiblemente aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y una composición molecular de anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es una célula o línea celular derivada de K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero y en la que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y una composición molecular de proteína/anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

Una célula huésped para producir una composición molecular de proteína/anticuerpo que tiene actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención como se describe en otras partes de la presente memoria, es la célula o línea celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, o NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X o una célula o línea celular derivada de las mismas como se describe en otras partes de la presente memoria, que crece en condiciones exentas de suero, preferiblemente aquellas en las que el ácido nucleico que codifica la molécula de proteína/anticuerpo puede ser introducido en estas células y la composición molecular de proteína/anticuerpo se aísla en condiciones exentas de suero.

Una composición de proteína/proteína puede ser aislada por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria.

Una composición molecular de proteína puede ser aislada por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria, que tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada y glicosilación totalmente humana en el sentido de la invención y descrita en otras partes de la presente memoria.

En una realización preferida adicional de la invención la molécula de proteína o parte de la misma tiene un tamaño de al menos 10 kDa, preferiblemente un tamaño de al menos 15 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 20 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 25 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 30 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 35 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 40 kDa, más

preferiblemente un tamaño de al menos 45 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 50 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 55 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 60 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 65 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 70 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 75 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 80 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 85 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 90 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 95 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 100 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 105 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 110 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 115 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 120 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 125 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 130 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 135 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 140 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 145 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 150 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 155 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 160 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 165 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 170 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 175 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 180 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 185 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 190 kDa, más preferiblemente un tamaño de al menos 195 kDa, lo más preferiblemente un tamaño de al menos 200 kDa.

En una realización preferida de la invención dicha composición molecular de proteína se origina a partir de cualquiera de las moléculas de proteína del grupo de las citocinas y sus receptores, por ejemplo los factores de necrosis tumoral TNF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotrofinas, p.ej. hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteneizante (LH), tirotrofina, y gonadotrofina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIC, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocinasa, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrofina-3, -4, -5, -6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), p.ej. M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), p.ej. IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadhesinas; Glicoforina A; MUC1.

En una realización más preferida de la invención dicha composición molecular de proteína se origina a partir de cualquiera de las moléculas de proteína del grupo de Glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferones, interleucinas, anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

También se describe una proteína de glicol o composición de proteína obtenible por los métodos de producción según la presente invención. Dicha proteína tiene preferiblemente las características de glicosilación definidas en la presente memoria.

Preferiblemente, dicha composición de proteína es una composición molecular de anticuerpo. Se puede aislar una composición molecular de anticuerpo por cualquiera de los métodos descritos en otras partes de la presente memoria que tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado y/o homogeneidad mejorada en el sentido de la invención y descrito en otras partes de la presente memoria.

Ejemplos de tales anticuerpos incluyen anticuerpos contra ganglíosido GD3, cadena alfa del receptor de interleucina-5 humana, HER2, quimiocina CC receptora 4, CD20, CD22, neuroblastoma, MUC1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En una realización preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptin, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Cetuximab (Erbitux), Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, Campath-1H, C2B8, Panorex, BrevaRex, Simulect, Antova, OKT3, Zenapax, ReoPro, Synagis, Ostavir, Protovir, OvaRex, Vitaxin.

En una realización más preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de Rituximab, Herceptin, anticuerpo anti-quimiocina CC receptora 4 KM2160, Campath-1H, C2B8, Erbitux, anticuerpo anti-neuroblastoma chCE7. En una realización incluso más preferida de la invención dicha composición molecular de anticuerpo se origina a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo del grupo de WO2004/065423, más preferiblemente PankoMab, más preferiblemente su

forma quimérica e incluso más preferiblemente su forma humanizada.

También se describe una proteína o composición de proteína obtenible por el método de producción de la presente invención, en donde la proteína es un anticuerpo que se une al epítopo de MUC1, que comprende la secuencia de aminoácidos DTR.

MUC1 es un marcador tumoral establecido expresado en diversos tumores epiteliales, y es una diana tumoral potencial. MUC1 es una glicoproteína transmembrana grande, altamente O-glicosilada. La porción extracelular consiste en un número variable de 20 a 120 repeticiones tándem (TR), cada una de las cuales consiste en 20 aminoácidos con cinco sitios de O-glicosilación potenciales. MUC1 no sólo se expresa en tejidos epiteliales sino también en células hematopoyéticas. Se conocen varios anticuerpos que se unen al motivo DTR de MUC1 que son también proteínas/anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención (para una visión en conjunto véase Karsten et al, 1998). Karsten también describió un nuevo epítopo conformacional inducido por carbohidratos en MUC 1 (TA MUC) de la estructura ...PDT*RP... donde T* es O glicosilado. Los glicanos presentes en este sitio son en sí estructuras de carbohidrato específicas a tumores.

Por tanto, es deseable usar un anticuerpo MUC que pueda discriminar entre el epítopo tumoral TA MUC y el epítopo no glicosilado. Un anticuerpo adecuado capaz de reconocer específicamente el epítopo TA MUC glicosilado es el anticuerpo PankoMab. Su producción se describe en detalle en Danielczyk et al 2006, incorporado totalmente en la presente memoria por referencia (PankoMab: a potent new generation anti-tumor MUC-1 antibody). Se usa preferiblemente el anticuerpo PankoMab o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC 1 como anticuerpo PankoMab parental. Tal variante de anticuerpo tiene al menos una de las siguientes características:

- se une a un epítopo que comprende al menos la secuencia de aminoácidos PDTRP;
- se une a un péptido MUC corto de 30 aminoácidos que comprende 1,5 TRs cuando está glicosilado con GalNacalfa en la secuencia PDTRP pero no si el mismo péptido no está glicosilado;
- muestra un efecto de longitud aditiva de más que 25, preferiblemente 28 (lo más preferiblemente una relación de 29,5);
- presenta una baja o incluso ninguna unión a células del sistema hematopoyético (con respecto al método de detección, por favor véase Danielczyk et al 2006, incorporado en la presente memoria por referencia);
- tiene una alta afinidad hacia células tumorales que varía de aproximadamente al menos Kass = 0,2 - 1 x $10^9 M^{-1}$ determinada por análisis de representación Scatchard.

Se dan ejemplos de variantes respectivas en los ejemplos. El anticuerpo puede ser de origen murino, quimérico o humanizado.

El anticuerpo que se une al epítopo TA-MUC 1, preferiblemente el anticuerpo PankoMab o los anticuerpos Panko 1 y Panko 2 descritos en la presente memoria, tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

(i) tiene un grado de sialilación aumentado con al menos una cantidad 15% más alta de ácido N-acetilneuramínico en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que la misma cantidad de moléculas de anticuerpo de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;

(ii) tiene un grado de galactosilación más alto con al menos una cantidad 5% más alta de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que la misma cantidad de moléculas de anticuerpo de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;

(iii) comprende una cantidad detectable de bisecGlcNAc;

(iv) no tiene o tiene menos que 2% de estructuras de manosa híbridas o altas.

Un patrón de glicosilación respectivo da como resultado el siguiente patrón de actividad sorprendente y beneficioso:

(i) una actividad CDC que es más que 15% más alta que la actividad del mismo anticuerpo expresado en células CHO;

(ii) una semivida en suero que es alargada en un factor 2 (más que 1,5) en comparación con un anticuerpo que no lleva sialilación detectable;

(iii) tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Se puede obtener un anticuerpo respectivo produciéndolo en líneas celulares según la presente invención que proporcionan un alto grado de sialilación y galactosilación, pero preferiblemente una fucosilación más baja. Son ejemplos adecuados NM-H9D8 y NM-H9D8-E6.

Las siguientes tablas y figuras ilustran la presente invención.

Las siguientes tablas 1 y 8 y figuras 1 a 17 ilustran la presente invención.

Tabla 1: Rendimiento de PankoMab quimérico expresado en CHOdhfr- y NM-F9 cultivadas en medio suplementado con FCS.

Tabla 2: Rendimiento de PankoMab quimérico expresado en NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivada en medio exento de suero.

Tabla 3: Cuantificación del contenido de ácido siálico en PankoMab y CetuxiMab: los anticuerpos fueron producidos por la línea celular indicada y cuantificados integrando el área de pico obtenida por cromatografía de fase inversa de las variantes de ácido siálico marcadas con DMB. NeuGc y NeuAc fueron diferenciadas usando un patrón de ácido siálico.

Tabla 4: Cuantificación de las estructuras diferentemente cargadas en Panko 1 y PankoMab: los N-glicanos marcados con 2-AB fueron sometidos a cromatografía de intercambio aniónico (columna Asahi-PAK) y los picos correspondientes a las estructuras diferentemente cargadas fueron cuantificadas por integración.

Tabla 5: El grado de galactosilación de los anticuerpos Panko1 y PankoMab se determinó por HPLC de aminofase (columna Luna-NH2) de los glicanos marcados con 2-AB. Los picos fueron cuantificados por integración y la estructura de glicano subyacente se analizó por espectroscopía de masas.

Tabla 6: Cuantificación de las estructuras triantenaria y biantenaria+biseccionada en Panko1 y PankoMab. Las fracciones que contienen GlcNAc potencialmente biseccionantes de la aminofase-HPLC se recogieron y sometieron a una cromatografía de fase inversa (columna RP-18). Mediante esto las estructuras triantenaria y biantenaria+biseccionada pueden ser distinguidas. El grado de fucosilación de los anticuerpos se determinó por HPLC de aminofase (columna Luna-NH2) de los glicanos marcados con 2-AB. Los picos fueron cuantificados por integración y la estructura de glicano subyacente se analizó por espectroscopía de masas. Se determinaron las estructuras fucosiladas y no fucosiladas y se cuantificaron las áreas de pico integradas.

Tabla 7: Rendimiento de hFSH expresado en CHOdhfr- y GT-2x cultivadas en medio suplementado con FCS (CHOdhfr-) o medio exento de suero.

Tabla 8: Rendimiento de hFSH expresado en NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivada en medio exento de suero.

Tabla 9: Combinaciones de actividad y glicosilación adecuadas obtenibles con el método descrito en la presente memoria.

Tabla 10: Valores obtenidos de bisecGlcNAc y fucosa en diferentes líneas celulares.

Figura 1: Expresión fut8 mARN de la célula NM-F9, NM-D4 y NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Como control sirvieron células HepG2.

Figura 2: Ensayo de liberación en europio con Cetuximab aislado de células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- o células SP2/0 contra células LS174T como células diana. El ensayo se incubó durante 4 h a una relación efector a célula diana de 50:1 con concentraciones de anticuerpo de 0 a 100 ng/ml.

Figura 3: La actividad ADCC de PankoMab quimérico aislado de NM-F9 es ~5 veces más alta que el PankoMab quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 4: Ensayo de liberación en europio con Panko1 quimérico aislado de células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- y células NM-H9D8 contra células ZR-75-1 como células diana. El ensayo se incubó durante 4 h a una relación efector a célula diana de 80:1 con concentraciones de anticuerpo de 0 a 1 µg/ml.

Figura 5: Actividad ADCC de Panko2 quimérico en un ensayo de liberación en europio contra células ZR-75-1 después de incubación durante una noche con una relación efector a célula diana de 50:1 y 5.000 células diana por pocillo. Las muestras se incubaron por triplicado.

Figura 6: Actividad ADCC de Panko2 quimérico en un ensayo de liberación en europio contra células ZR-75-1 después de incubación durante una noche con una relación efector a célula diana de 50:1 y 10.000 células diana por

pocillo. Las muestras se incubaron por triplicado.

Figura 7: Ensayo CDC con PankoMab quimérico contra ZR-75-1.

Figura 8: La actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de NM-F9 al péptido MUC1 30-mer glicosilado sintético es aproximadamente 50% más alta que la actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 9: La actividad de unión del Panko2 quimérico aislado de GT-2x y NM-H9D8 al péptido MUC1 30-mer glicosilado sintético es aproximadamente 50% más alta que la actividad de unión del Panko2 quimérico aislado de las células CHOdhfr-.

Figura 10: Se realizó análisis Western blot para identificar la diferentemente sialilada cadena pesada de composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas por anticuerpos IgG anti-humanos secundarios (Fig. 10A) o bien SNA (Fig. 10B) que detecta sialilación 2-6.

Figura 11: Se realizó análisis Western blot para identificar la diferentemente sialilada cadena pesada de composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr- o NM-H9D8. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas por SNA que detecta sialilación 2-6.

Figura 12: Se realizó análisis ELISA para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de anticuerpo expresadas en CHOdhfr-, GT-2x, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6.

Figura 13: Se realizó análisis ELISA para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de Cetuximab expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8. La sialilación fue analizada (A) por SNA, que detecta sialilación alfa2-6 con o sin tratamiento con neuraminidasa y (B) por MAL I, que detecta sialilación alfa2-3.

Figura 14: Puntos "dot blots" teñidos por SNA de los anticuerpos quiméricos Panko1 y Panko2 aislados de células CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6.

Figura 15: El PankoMab quimérico aislado de células NM-H9D8 está disponible en el suero de ratones desprovistos de sistema inmune más tiempo que el aislado de NM-F9.

Figura 16: Análisis SDS-Page de hFSH producida en NM-F9 (calle 1) y GT-2x (calle 2). 5 µg de hFSH purificada fueron separados por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras por calle y teñidas por Azul Brillante de Coomasie. El Marcador indica un intervalo de 21-108 kD.

Figura 17: Se realizó análisis Western blot para identificar las diferentemente sialiladas composiciones moleculares de hFSH. 1 µg de composición molecular de hFSH de CHO (calle 1) y GT-2x (calle 2) fueron separados por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas con SNA que detecta la sialilación 2-6.

Figura 18: muestra un anticuerpo IgG, en donde los N-glicanos están unidos covalentemente en un residuo Asn 297 conservado en el dominio C_H2 de Fc. Como se indicó, pueden haber oligosacáricos N-enlazados adicionales en el dominio Fab, que pueden incluso influir en la actividad de unión del anticuerpo. Se muestran las estructuras de glicano sólo en una mitad del anticuerpo. El carbohidrato Fc es una estructura de cadena ramificada que está situada principalmente dentro de los dos dominios C_H2, con un brazo/antena de cada oligosacárido interactuando con las áreas hidrófobas de los dominios C_H2. El análisis estructural de IgGs humanos policlonales y de mieloma ha demostrado que el Fc contiene diversas cantidades de una estructura central biantenaria base, como se demuestra en la Fig. 18. El significado de los símbolos se muestra en la tabla correspondiente. Dicha estructura central puede contener ninguno (G0), uno (G1) o dos (G2) residuos de galactosa terminales y/o un residuo GlcNAc bisectora y/o un residuo de fucosa en la GlNAc proximal. También pueden estar presentes más moléculas de fucosa en los otros residuos GlcNAcc o los residuos de galactosa. La diversidad es aumentada incluso, ya que el ácido siálico terminal puede estar presente o no dependiendo de las propiedades del anticuerpo, ya que se reportó que el ácido siálico tiene un impacto negativo sobre ADCC.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis de la expresión de fut8 en células

Se extrajo ARN de células NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, K562, NM-H9D8 [DSM ACC2806], GT-2x [DSM ACC2858] y Hep2 (control) según procedimientos estándar (Rneasy-Mini-Kit, Qiagen). El mARN se aisló usando tecnología de perlas magnéticas según las instrucciones del fabricante (HDynabeads® Oligo(dT)25H, Invitrogen). Para la síntesis de PcADN de primera hebraP, se usaron 50 µl de suspensión de perlas de cada muestra y Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Para la reacción PRT-PCR posteriorP se usaron 5 µl del cADN productoPP y cebadores fut8 específicos, dando como resultado un

fragmento de 212pb. Como control se usaron cebadores específicos de actina dando como resultado un fragmento de 240pb. El PCR-producto(s)P ^{P} resultante se analizó en un gel al 1,5%.

NM-F9, NM-D4, NM-H9, K562, NM-H9D8 y GT-2x sí expresan el mARN para fut8.

La Figura 1 muestra como un ejemplo la expresión mARN para fut8 de NM-F9, NM-D4 y NM-H9D8.

Ejemplo 2

Glicoingeniería de células K562

Se describe la glicoingeniería de células K562 y la generación de la línea celular NM-D4 y NM-F9 en la patente europea EP1654353.

Las células NM-H9, y una célula o línea celular derivada de la misma con alto potencial de sialilación se generaron como sigue. Se realizó mutagénesis aleatoria tratando células K562 con el agente de alquilación metanosulfonato de etilo. Por muestra, se lavaron células K562 en PBS y se sembraron a 10P^{6P} células por ml de cultivo celular suplementado con EMS (0,1 mg/ml, metanosulfonato de etilo, Sigma-Aldrich) durante una noche a 37ºC y 5% de COB_{2B}. Las células se lavaron y dotaron de medio fresco. Cada segundo día la vitalidad celular se midió por tinción con azul tripán, y las células se analizaron por tinción inmunocitoquímica.

Posteriormente, las células que exponían el nuevo fenotipo de alta expresión TF se seleccionaron por medio de un anticuerpo específico a TF. Se lavaron las células K562 en B-PBS (0,5% BSA en PBS), se incubaron con 50 µl de sobrenadante de cultivos de hibridoma del anticuerpo monoclonal A78-G/A7 o PankoMab y 950 µl de B-PBS a 4ºC durante 30 min. Después de lavar se repitió el procedimiento con 50 µl de anticuerpo IgM anti-ratón de rata o IgG anti-ratón de rata conjugado con MicroBeads (Miltenyi Biotec, Köln, Alemania). Después de lavar las células K562 positivas a TF marcadas magnéticamente fueron separadas por dos columnas sucesivas proporcionadas por Miltenyi Biotec (Köln, Alemania) como se describe en el manual del fabricante. Después de nueve días de cultivo, el procedimiento de aislamiento se repitió en total tres veces. El análisis FACS (citometría de flujo) comenzó con tinción de anticuerpo: se incubaron aproximadamente $3x10^5$ células a 4ºC durante 1,5 h con anticuerpo monoclonal primario (sobrenadantes de cultivo de hibridoma de A78-G/A7 (IgM), PankoMab (IgG1), todos diluidos 1:2 en medio de cultivo celular) seguido del anticuerpo IgG o IgM anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 secundario diluido 1:200 en PBS, a 4ºC durante 30 min y se lavaron de nuevo. Las células resuspendidas (200 µl de PBS) se investigaron por citometría de flujo (citómetro de flujo: Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo usando el programa informático Expo32 (Becton Coulter) con los siguientes parámetros para células marcadas con anticuerpos: dispersión delantera (FS): 26 V, ganancia 1, dispersión lateral (SS): 807 V, ganancia 5, FL2: 740 V, ganancia 1, y los siguientes parámetros para células marcadas con lectina: FS: 26 V, ganancia 1, SS: 807 V, ganancia 5, FL1: 740 V, ganancia 1).

Después de tres rondas de aislamiento se recibió una población celular K562 de 93% de células positivas a TF. Sin embargo, el porcentaje de células K562 positivas a TF disminuyó con el tiempo alcanzando un nivel de fondo de aproximadamente 20% de células positivas a TF durante un periodo de 14 días después del procedimiento de aislamiento. Para la expresión estable del fenotipo TF-positivo, las células K562 fueron aisladas durante una cuarta vez y finalmente, las células K562 positivas a TF fueron clonadas después por dilución limitada en placas de 96 pocillos (1 célula/100 µl). Entre treinta clones celulares K562 que se obtuvieron, diecisiete clones celulares expresaron bajas cantidades del antígeno TF o ningún antígeno TF. Estos clones celulares fueron analizados para unión a SNA en citometría de flujo y para velocidades de proliferación (análisis de tiempo de doblado, véase mas adelante). Los clones celulares que mostraron alta unión a SNA y alta velocidad de proliferación se seleccionaron. Se seleccionó un clon NM-H9 estable para desarrollo de clones posterior por clonación celular única y para optimizar el crecimiento en condiciones exentas de suero. Como clon celular más preferido se seleccionó NM-H9D8 [DSM ACC2806] y se depositó bajo DSM ACC2806 en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikrooganismen un Zellkulturen GmbH" in Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 15 de septiembre del 2006.

Ejemplo 3

Cultivo de líneas celulares K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 y GT-2X y células CHOdhfr- y generación de líneas celulares exentas de suero

Se cultivaron K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], o GT-2X [DSM ACC2858] en RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS y glutamina 2 mM o exentas de suero en medio X-Vivo 20 y crecieron a 37ºC en una atmósfera humidificada de 8%.

Se cultivaron células CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096) en DMEM suplementado con 10% de FCS, glutamina 2 mM, y 2% de suplemento HT o exentas de suero en medio CHO-S-SFM II y crecieron a 37ºC en una atmósfera humidificada de 8%.

K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], o GT-2X [DSM ACC2858] y célula o línea celular derivada de dichas células huésped son adaptadas fácilmente a condiciones exentas de suero mediante un cambio completo del medio de cultivo celular. Las células y líneas celulares se inoculan en un medio exento de suero como X-Vivo 20 a una densidad de 1 x 10<5> a 5 x 10<5> células/ml, preferiblemente 2 x 10<5> células/ml, y cultivadas por un método de cultivo habitual para células animales. Después de 4 a 7 días de cultivo, las células cuya densidad alcanzó 5 x 10<5> a 10 x 10<5> células/ml se seleccionan como las células adaptadas a un medio exento de suero. La adaptación a medios exentos de suero también puede ser realizada por dilución sucesiva del medio suplementado con FCS mediante una composición de medio exento de suero (adaptación continua). La productividad de clones de producción FCS convertidos de células huésped que producen composición de anticuerpo a condiciones libres de suero es mayoritariamente conservada.

La adaptación de CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096) a condiciones libres de suero tiene que ser realizada por etapas y lleva varias semanas, por lo que es usual una pérdida de productividad de al menos la mitad.

Ejemplo 4

Clonación de vectores para expresar los anticuerpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2 o Cetuximab en células eucarióticas

Se amplificaron por PCR secuencias variables de PankoMab con cebadores específicos a partir de las células de hibridoma murino que producen PankoMab [Hcancer Immunol immunother.H 2006 Nov;55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al].

Se describen las secuencias variables VH y VL de Panko1 y Panko2 en la solicitud de patente internacional WO2004/065423, incorporada en la presente memoria por referencia.

Cadena Pesada variable de Panko1:

EVKLVESGGGLVKPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA

TYYAESVKGRFTISRDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQKTTLTVS

Cadena Ligera variable de Panko1:

DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG

VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELK,

Cadena Pesada variable de Panko2:

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT

THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNNLRVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVS

Cadena Ligera variable de Panko2:

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNLASG

VPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKR

Se obtuvieron secuencias de aminoácidos variables de Cetuximab VH y VL de http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=BTD00071.txt y se tradujeron a la inversa en secuencias codificantes de cADN usando VectorNTI.

Cadena Pesada variable de Cetuximab:

QVQLKQSGPGLVQPAQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDY

N

TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVS

Cadena Ligera variable de Cetuximab:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS

RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR

La secuencia de cADN fue extendida mediante NcoI/NheI en el caso para el VL y NcoI/SalI en el caso del VH y se generó el cADN. Los fragmentos VH de cadena pesada variable de corte NcoI/XhoI fueron clonados en el vector BS-

Leader de corte NcoI/SalI como se describe en la solicitud de patente internacional WO2004/065423. El vector BS-Leader incluye una caja de clonación para introducir la secuencia del péptido de señal del receptor de linfocitos T en el extremo 5' y una secuencia donadora de empalme en el extremo 3' de los dominios variables. La cadena ligera variable VL del correspondiente anticuerpo fue amplificada con un cebador específico en el extremo 3' que codifica adicionalmente el sitio donador de empalme y fue clonado por medio de NcoI/NheI en el asimismo digerido vector BS-Leader. Después, cada fragmento HindIII/BamHI del vector BS-Leader fue clonado en el correspondiente vector de expresión eucariótica. Estos vectores (pEFpuroCgamma1VB_{HB}, pEFdhfrCkappaVB_{LB}, pEFdhfrB_{mutB}CkappaVB_{LB}) comprenden promotor EF-1alfa y potenciador HCMV, origen SV40, señal de poliadenilación, gen de resistencia a la puromicina en el vector para la cadena pesada y el gen de dihidrofulasa murina (dhfr) para expresión de células CHO o SEQ ID 1 (Secuencia 1#) para expresión en K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], o GT-2X [DSM ACC2858] para selección y amplificación de genes en el vector para la cadena ligera, así como las secuencias genómicas de la región gamma1 constante humana para la cadena pesada o la región kappa constante humana para la cadena ligera (cebadores para amplificación a partir de ADN humano genómico y mapa de vectores, véase solicitud de patente internacional WO2004/065423).

Ejemplo 5

Transfección de células eucarióticas para expresar los anticuerpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2, o Cetuximab y procedimiento de amplificación de genes para generar clones celulares de alta producción en presencia de suero

Para expresar los anticuerpos quiméricos en NM-F9 [DSM ACC2606] o CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] las células fueron co-transfectadas con una mezcla de los vectores descritos anteriormente para las cadenas pesada y ligera (1:1 a 1:3) por lipofección usando DMRIE-C o electroporación para las células en suspensión como NM-F9 y lipofectamina o electroporación para la línea celular adherente CHOdhfr-. Dos días después de la transfección, el medio de cultivo fue cambiado a medio de selección (NM-F9 en RPMI 1640 + 10% FCS + L-glutamina 2 mM + 0,75 µg/ml puromicina + metotrexato 50 nM; CHOdhfr- en DMEM 10% FCS dializado + L-glutamina 2 mM + 5 µg/ml puromicina + metotrexato 50 mM) durante 1 semana. La primera amplificación fue realizada aumentando la concentración de metotrexato a 100 nM durante 2 semanas adicionales. Parte de la población celular amplificada fue clonada por clonación de célula única en medio sin adición de puromicina y metotrexato, el resto de las células fueron sometidas a una nueva ronda de amplificación de genes aumentando la concentración de metotrexato. De esta manera se realizaron cuatro a seis rondas de amplificación de genes (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM de metotrexato). Adicionalmente, los clones mejores productores identificados por cribado y análisis de clones fueron amplificados más de manera similar.

Después de la clonación de célula única en placas de 96 pocillos usando dilución limitada (0,5 células por pocillo), las placas fueron cultivadas durante 2 a 3 semanas, analizadas microscópicamente para clones celulares crecientes, y se determinó la eficacia de clonación en % (número de pocillos con clones celulares crecientes x 100 / número teórico de células sembradas). Los clones crecientes fueron cribados en cuanto a productividad usando diferentes procedimientos para las células CHOdhfr- adherentes o para las células en suspensión NM-F9.

CHOdhfr-: Se lavaron células de clones crecientes con PBS y se recogieron mediante tratamiento con Acutasa. La mitad de las células resuspendidas fueron sembradas en una placa de ensayo de 96 pocillos, la otra mitad se sembró en una placa de 24 pocillos para cultivo adicional. La placa de ensayo se cultivó durante 20 a 24 h. El sobrenadante de cada pocillo fue analizado en cuanto a título de anticuerpos como se describe en Determinación de tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g) (véase más adelante). La densidad celular relativa se midió usando el ensayo MTT. En detalle, las células fueron incubadas con disolución MTT durante 2 h, la disolución fue descartada y las células lisadas mediante una disolución de HCl 0,04 M en 2-propanol. Después de 2 horas la placa fue mezclada moderadamente y medida usando un fotómetro de placas de microtitulación con filtro de 570 nm en modo dual frente a filtro de referencia de 630 nm.

NM-F9: se centrifugaron las placas de 96 pocillos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 200 µl de medio fresco. La mitad de las células resuspendidas se sembraron en una placa de ensayo de 96 pocillos y diluidas con 100 µl de medio, la otra mitad permanece en las placas de clonación para cultivo adicional. Después de 2 días de cultivo, la placa de ensayo fue centrifugada y se analizaron 20 µl de sobrenadante en cuanto a título de anticuerpos como se describe en Determinación de tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g) (véase más adelante). La densidad celular relativa se midió usando el ensayo WST-1 por adición de 10 µl de disolución WST-1 (Roche) en cada pocillo. Después de 1 a 3 horas de incubación la medida se realizó usando un fotómetro de placas de microtitulación con filtro de 450 nm en modo dual frente a filtro de referencia de 630 nm.

Los clones celulares con una alta relación de título de anticuerpo a densidad celular fueron seleccionados y cultivados, y analizados después.

Las condiciones para K562, NM-D4 y NM-H9 fueron las mismas.

Determinación de la tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g)

Para cada clon, se sembraron $2x10P^{4P}$ por pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en 500 µl de medio de crecimiento. Se dejaron crecer las células durante 3 días, se recogieron en medio condicionado para análisis, y las células fueron retiradas si era necesario mediante Acutasa y contadas. Los títulos de anticuerpo específico fueron determinados cuantitativamente a partir de muestras de medios por ELISA. Las placas de ensayo fueron revestidas con un anticuerpo específico a la cadena kappa humana (BD). El anticuerpo recombinante unido fue detectado con conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) IgG (H+L) antihumano (Jackson Immunoresearch Laboratories). Para la cuantificación, se usó anticuerpo quimérico recombinante purificado como estándar.

El SPR medido en picogramos de proteína específica por célula por día (pcd) es función tanto de velocidad de crecimiento como productividad, y se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$SPR = \frac{\text{masa de proteína total}}{\text{área celular integral (ICA)}}$$

$$ICA = \frac{\text{(número de células final - número de células inicial) x días en cultivo}}{\text{Log } B_{eB} \text{ (número de células final / número de células inicial)}}$$

El tiempo de doblado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$g = \log 2x \text{ (horas en cultivo) / log (número de células final - número de células inicial)}$$

Determinación del rendimiento medio y rendimiento máximo para las líneas celulares

Después de la clonación de célula única en placas de 96 pocillos usando dilución limitada (0,5 células por pocillo) como se describe anteriormente, de 200 clones únicos puestos teóricamente en placa, se determina la SPR para clones celulares crecientes y se determina la media y desviación, así como el rendimiento máximo para las diferentes líneas celulares y diferentes condiciones. La Tabla 1 compara los datos de clones celulares productores de PankoMab quiméricos de CHOdhfr- y NM-F9 desarrollados bajo condiciones que contienen suero.

Ejemplo 6

Generación de clones celulares de alto rendimiento exentos de suero que producen composición molecular de anticuerpo

Se realizó la transfección de NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6,Q12, o GT-2x adaptados a medio exento de suero X-Vivo 20 bajo condiciones exentas de suero usando DMRIE-C o electroporación (Nucleofector, Amaxa). Dos días después de la transfección, el medio de crecimiento fue cambiado a medio de selección (X-Vivo 20 + 0,75 µg/ml puromicina + metotrexato 50 nM) durante 1 semana. La primera amplificación fue realizada aumentando la concentración de metotrexato a 100 nM durante 2 semanas adicionales. Parte de la población celular amplificada fue clonada por clonación de célula única en X-Vivo sin adición de puromicina y metotrexato, el resto de las células fueron sometidas a una nueva ronda de amplificación de genes aumentando la concentración de metotrexato. De esta manera se realizaron cuatro a seis rondas de amplificación de genes (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM de metotrexato). Adicionalmente, los clones mejores productores identificados por cribado y análisis de clones fueron amplificados más de manera similar. Después de la clonación de célula única en placas de 96 pocillos usando dilución limitada (0,5 células por pocillo), las placas fueron cultivadas durante 2 a 3 semanas, analizadas microscópicamente para clones celulares crecientes, y se determinó la eficacia de clonación en % (número de pocillos con clones celulares crecientes x 100 / número teórico de células sembradas). Los clones crecientes fueron cribados en cuanto a productividad usando el mismo procedimiento que para la suspensión de células NM-F9 en presencia de suero (véase anteriormente).

Determinación del rendimiento medio y rendimiento máximo para los clones celulares

Después de la clonación de célula única en placas de 96 pocillos usando dilución limitada (0,5 células por pocillo) como se describe anteriormente, de 200 clones únicos puestos teóricamente en placa, se determina el SPR para clones celulares crecientes y se determina la media y desviación, así como el rendimiento máximo para diferentes condiciones. La Tabla 2 muestra datos de clones celulares productores de PankoMab quiméricos de NM-H9D8 [DSM ACC2806] desarrollados completamente bajo condiciones exentas de suero.

Las tasas de producción específica (SPR) después de la amplificación en las líneas celulares según la invención son más altas que en CHOdhfr-, y las más altas en células NM-H9D8 [DSM ACC2806] productora de PankoMab quimérico desarrolladas bajo condiciones exentas de suero.

La tasa de producción de la mayoría de clones es altamente estable durante al menos 6 semanas sin presión de

selección. El mejor clon fue estable con una SPR de 30 pcd durante 6 semanas con una velocidad de doblado de 24 h.

Los datos reflejan la productividad de clones a pequeña escala de laboratorio con potencial adicional en aumento de productividad mediante desarrollo del procedimiento, optimización de medios y fermentación.

Mayor productividad y rendimiento de los clones de producción desarrollados bajo condiciones exentas de suero son ventajosos y las condiciones son las mismas para todos los demás anticuerpos y para todas las líneas celulares como K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], o GT-2x [DSM ACC2858] adaptadas a condiciones exentas de suero.

Ejemplo 7

Aislamiento de una composición molecular de anticuerpo

Para la producción y aislamiento de una composición molecular de anticuerpo según la invención, las células transfectadas de manera estable que secretan los anticuerpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2, o Cetuximab fueron cultivadas en medio exento de suero hasta que se alcanzó una densidad celular de aproximadamente 1 a 2 x $10P^{6P}$ células/ml. Después de la retirada de las células del sobrenadante del cultivo celular por centrifugación (400 x g, 15 min), el anticuerpo quimérico fue purificado usando una columna de proteína A (HiTrap r-protein A FF, Amersham Pharmacia Biotech). La fracción de anticuerpo purificado eluida por cambio repentino de pH se volvió a amortiguar en PBS y se concentró usando tubos de centrífuga Centriprep (corte 50 kDa, Millipore).

Ejemplo 8

Determinación de la citotoxicidad celular mediada por Fc de composiciones moleculares de anticuerpos según la invención

Aislamiento de PBMC de donantes de sangre como células efectoras

Se aislaron PBMC de sangre de donantes sanos por centrifugación de densidad con Ficoll-Hypaque (Biochrom). Las células se lavaron 3 veces con RPMI 1640 suplementado con 5% de FCS y se crioconservaron en lotes independientes de $5x10^7$ células. Se descongelaron las PBMC y se usaron directamente o se mantuvieron durante una noche en RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS (RPMI/FCS) antes del uso en citometría de flujo o como células efectoras en los ensayos citotóxicos.

Detección de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en un modelo in vitro

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de los anticuerpos recombinantes según la invención fue investigada en un ensayo de liberación de europio. Se incubaron células diana (ZR-75-1, 5 x 10^6) durante 6 minutos en hielo en 800 µl de tampón de europio (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, ácido dietilentriaminpentaacético 10 mM, acetato de europio(II) 2 mM), se electroporaron (710 V, 1 pulso, 30 µs) en un Multiporator (eppendorf), y posteriormente se incubaron en hielo durante otros 6 minutos. Después, se lavaron las células 5 veces en RPMI 1640/5% FCS y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc; $1x10^4$ células en 100 µl por pocillo). Después de la adición de 20 µl de anticuerpos recombinantes a concentración variante (0,5 a 25 µg/ml de concentración final en 200 µl de volumen de incubación) o los correspondientes controles (medio, isotipo IgG humano de control), se añadieron células de sangre periférica humana (80 µl por pocillo) como células efectoras, usando una relación efector/célula diana de 50:1. Se añadieron 80 µl de RPMI/FCS sin células efectoras para determinar la liberación espontánea. La liberación máxima se determinó después de la lisis completa de las células diana con etanol. Después de la incubación en un incubador a 37ºC durante 4 horas, la placa se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetearon 25 µl de cada muestra en 200 µl por pocillo de disolución de potenciación (Perkin-Elmer Wallac). Después de la incubación durante 15 min a temperatura ambiente, se determinó la fluorescencia (Victor P^{2P} Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea) / (lisis máxima - lisis espontánea)*100.

Alternativamente, las células diana (LS174T o ZR-75-1, 3 x 10^6 células) se incubaron durante 6 minutos en hielo en 100 µl de tampón de europio (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, ácido dietilentriaminpentaacético 10 mM, acetato de europio(II) 2 mM), se electroporaron en un Nucleofector II (Amaxa) con programa A-011, y posteriormente se incubaron en hielo durante otros 6 minutos. Después, se lavaron las células 4 veces en RPMI 1640/5% FCS y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc; 5 a 10 $x10^3$ células en 100 µl por pocillo). Después de la adición de 20 µl de anticuerpos recombinantes a concentración variante (0,001 a 100 ng/ml de concentración final en 200 µl de volumen de incubación para Cetuximab; 0,16-5 µg/ml para Pankomab quimérico, Panko1 o Panko2) o los correspondientes controles (medio, isotipo IgG humano de control), se añadieron células de sangre periférica humana (80 µl por pocillo) como células efectoras, usando una relación efector/célula diana de 100:1 a 50:1. Se añadieron 80 µl de RPMI/FCS sin células efectoras para determinar la liberación espontánea. La liberación máxima se determinó después de la lisis completa de las células diana con 1% de Triton X-100. Después de la incubación en un incubador a 37ºC durante 4 horas o durante una noche, la placa se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetearon 25 µl de cada muestra en 200 µl por pocillo de

disolución de potenciación (Perkin-Elmer Wallac). Después de la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se determinó la fluorescencia (Victor^2 Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea) / (lisis máxima - lisis espontánea)*100.

La actividad ADCC del Cetuximab aislado de la línea celular fut8 NM-H9D8-E6 es significativamente más alta que la actividad ADCC del Cetuximab aislado de las células CHOdhdr- o células SP2/0. Como se muestra en la figura 2, el Cetuximab aislado de NM-H9D8-E6 induce la misma lisis específica de células LS174T a concentraciones de anticuerpo aproximadamente 30 veces más bajas que el Cetuximab aislado de células CHOdhdr- o de SP2/0 (Erbitux, obtenido de Merck). Esto indica una actividad ADCC 30 veces más alta en comparación con el producto disponible en el mercado. Este resultado se obtiene usando el método de producción de la presente invención, dando como resultado un patrón de glicosilación optimizado.

También, la actividad ADCC del PankoMab quimérico aislado de NM-F9 [DSM ACC2606], K562, NM-H9, NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], GT-X2 [DSM ACC2858], o NM-H9D8 [DSM ACC2806] es aproximadamente 5 veces más alta que la actividad ADCC del PankoMab quimérico aislado de células CHOdhfr-. Aproximadamente un quinto de la concentración de PankoMab quimérico conduce a la misma actividad ADCC que el PankoMab quimérico expresado en las células CHOdhfr-. La figura 3 muestra los resultados respectivos usando la línea celular NM-F9 para fines de comparación.

La actividad ADCC del Panko1 quimérico aislado de NM-H9D8-E6 o NM-H9D8-E6Q12 es aproximadamente 8 veces más alta que la actividad ADCC del Panko1 quimérico aislado de células CHOdhfr-. Aproximadamente un octavo de la concentración de PankoMab1 quimérico conduce a la misma actividad ADCC que el PankoMab1 quimérico expresado en las células CHOdhfr-. Los resultados respectivos se muestran en la figura 4.

La actividad ADCC del Panko2 quimérico aislado de NM-H9D8 o GT-2X es aproximadamente 6 veces más alta que la actividad ADCC del Panko2 quimérico aislado de células CHOdhfr-. Aproximadamente un sexto de la concentración de PankoMab2 quimérico conduce a la misma actividad ADCC que el PankoMab2 quimérico expresado en las células CHOdhfr-. Los resultados respectivos se muestran en la figura 5.

La actividad ADCC del Panko2 quimérico aislado de NM-H9D8-E6 es más baja que la actividad ADCC del Panko2 quimérico aislado de células NM-H9D8. Los resultados respectivos se muestran en la figura 6.

Detección de la citotoxicidad celular dependiente del complemento en un modelo in vitro

La citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC) de anticuerpos se fue investigada en un ensayo de liberación de europio. Se prepararon células diana cargadas con Eu3+ (ZR-75-1, 3 x 10^6) como se describe anteriormente.

Después, se sembraron las células en placa de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc; 5x10^3 células en 100 µl por pocillo). Después de la adición de 20 µl de anticuerpos a concentración variante (0,5 a 50 µg/ml de concentración final en 200 µl de volumen de incubación) o los correspondientes controles (medio, isotipo IgG humano de control), las células fueron incubadas media hora a temperatura ambiente. Después, se añadieron 10 µl por pocillo de complemento de cría de conejo (Cedarline, diluido 1:5 a 1:10). Se añadieron 10 µl de RPMI/FCS sin complemento para determinar la liberación espontánea. La liberación máxima se determinó después de la lisis completa de las células diana con etanol o 1% de Triton X-100. Después de la incubación en un incubador a 37ºC durante 3 a 3,5 horas, la placa se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetearon 25 µl de cada muestra en 200 µl por pocillo de disolución de potenciación (Perkin-Elmer Wallac). Después de la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se determinó la fluorescencia (VictorP^{2P} Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea) / (lisis máxima - lisis espontánea)*100.

La actividad CDC del PankoMab quimérico aislado de células NM-F9 es 8 veces más alta que la actividad CDC del PankoMab quimérico aislado de células CHOdhfr-. La misma lisis específica es inducida a concentración 8 veces más baja de PankoMab quimérico aislado de NM-F9 en comparación con PankoMab quimérico aislado de células CHOdhfr-. Los resultados respectivos se muestran en la figura 7.

Ensayo de formación de conjugado (CFA) para analizar la actividad de fagocitosis de composiciones moleculares de anticuerpos

Tinción de células tumorales con PKH26:

Se lavaron células tumorales 1x10P^{7P} a 2x10P^{7P} dos veces en PBS, se resuspendieron en 1 ml de diluyente C, se añadió 1 ml de PKH26 a concentración 12 x 10P^{-6P} M para ZR-74-1, ZR-74-1TF, MCF-7 y MT-3.

Después de 3 min de incubación a TA, la tinción fue detenida añadiendo 2 ml de FCS durante 1 min a TA. Se añadió medio (4 ml, RPMI suplementado con 1% de L-glutamina, 10% de FCS), las células fueron revueltas y lavadas 4 veces con medio. Las células tumorales se incubaron durante una noche a 37ºC, 5% de COB_{2B} para permitir la liberación del exceso de PKH-26.

Se realizó optimización de la tinción con PKH-26 con la mitad de los números de células y volúmenes.

CFA:

Se recogieron células tumorales marcadas con PKH-26 con tripsina/EDTA, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron a 0,8 x $10P^{6P}$ células/ml en medio celular MAK (Invitrogen) en presencia o ausencia de composiciones moleculares de anticuerpos recombinantes. Se sembraron las células tumorales (250 µl, 0,2 x $10P^{6P}$ células) en tubos de polipropileno no adherentes.

Las células MAK se prepararon según Boyer et al., Exp Hematol. 27, 751-761 (1999), se lavaron y resuspendieron a 1,6 x $10P^{6P}$ células/ml. Se añadieron 250 µl de células MAK (0,2 x $10P^{6P}$ células) a las células tumorales marcadas con PKH-26 (relación E:T 2:1). Las muestras individuales se incubaron en duplicados a 4ºC y 37ºC/5% COB_{2B} durante 3 h o durante una noche (18-20 h).

Después de incubación a 3 h o durante una noche las células se lavaron con PBS y se tiñeron con CD11c-FITC (1:18,5) + 7-AAD (1:500) en PBS/10% FCS. Se lavaron las células con PBS, se resuspendieron en 400 µl de PBS. La adquisición se hizo en 10.000 células en un Epics XL (Beckman Coulter). Se determinó el porcentaje de células MAK colocalizadas como porcentaje de células PKH-26 positivas en la población celular seleccionada para todas las células CD11c-FITC positivas viables.

Ejemplo 9

Análisis de la actividad de unión de composiciones moleculares de anticuerpos en ELISA

Para analizar la unión a antígenos de composiciones moleculares de anticuerpos expresadas en diferentes líneas celulares se midieron composiciones moleculares de anticuerpos purificadas de Pankomab quimérico y Panko2 en un ELISA en péptido MUC1 30-mer glicosilado sintético con la secuencia APPAHGVTSAPDT [GalNAcalfa]RPAPGSTAPPAHGVTSA. El péptido MUC1 no glicosilado sirvió como control.

Usando disoluciones patrón (1 mg en 1 ml de $HB_{2B}O$ bidestilada) almacenadas en porciones a -20ºC, se produjo una dilución de 1 µg/ml en PBS. Se pipetearon 50 µl/pocillo en una NUNC Immuno plate F96 MaxiSorp, y la placa de ensayo se incubó a 4ºC durante una noche. Al día siguiente, la placa de ensayo se lavó 3 veces con PBS/0,2% Tween-20. Posteriormente, los sitios de unión no específicos se bloquearon con 2% de BSA en PBS, se incubó durante al menos 1 h a temperatura ambiente, y se aplicaron 50 µl del PankoMab recombinante (1 - 400 ng/ml de PBS/1% BSA). Después de tres etapas de lavado con PBS/0,2% Tween-20, se empleó anticuerpo Fcγ1 anti-humano secundario acoplado con peroxidasa para detectar el anticuerpo unido específicamente. Para detectar el anticuerpo secundario unido, se realizó una reacción de color con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). Después de 15 minutos la reacción fue detenida añadiendo $HB_{2B}SOB_{4B}$ 2,5 N. La medida se realizó usando un fotómetro con placa de microtitulación con filtro de 450 nm en modo dual frente a filtro de referencia de 630 nm.

La actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de NM-F9 es aproximadamente 50% más alta que la actividad de unión del PankoMab quimérico aislado de las células CHOdhfr- (Fig. 8).

La actividad de unión del Panko2 quimérico expresado y aislado del clon de alta sialilación NM-H9D8 en ELISA es comparable ala de GT-2x y más alta en comparación con la de células CHOdhfr- (Fig. 9).

Ejemplo 10

Análisis de glicanos de composiciones moleculares de anticuerpos expresadas en células NM-F9, NM- y CHOdhfr-

Los glicanos de al menos 100 µg de anticuerpo purificado fueron escindidos por hidrólisis ácida. Los ácidos siálicos fueron marcados específicamente por conjugación con el colorante fluorescente DMB. El análisis se realizó por HPLC p.ej. en una columna Asahipak-NH2 para separar los sacáridos. La identificación y cálculo de ácidos siálicos se realizó por sustancias estándar de ácidos siálicos apropiados.

El análisis de la composición molecular de anticuerpo PankoMab quimérico expresada en células CHOdhfr- o NM-F9 reveló <10% de monosialilación del producto de CHOdhfr- y casi ninguna sialilación del producto de NM-F9 o GT-2x. Este último contenía sólo glicanos no cargados.

En más detalle, los glicanos de al menos 100 µg de anticuerpo purificado fueron escindidos por hidrólisis ácida. Los ácidos siálicos fueron marcados específicamente por conjugación con los colorantes fluorescentes como DMB. El análisis se realizó por HPLC p.ej. por cromatografía de fase inversa en una columna RP-18. La identificación y cálculo de ácidos siálicos se realizó por sustancias estándar de ácidos siálicos apropiados.

Para la determinación de las estructuras de glicano cargadas y el estado de galactosilación se digirieron 100 µg de anticuerpos mediante tripsina y se obtuvieron los N-glicanos por tratamiento con PNGasaF. Los glicanos purificados fueron marcados con 2-aminobenzamida (2-AB) y sometidos a una cromatografía HPLC de intercambio aniónico (columna Asahi-PAK) para la determinación de estructuras de glicano cargadas. Para la determinación del estado de galactosilación los N-glicanos fueron tratados por neuraminidasa para el agotamiento del contenido de ácido siálico y

separados por una HPLC Aminofase (columna Luna-NH2) y los picos se analizaron por espectroscopía de masas.

Los glicanos que llevan potencialmente GlcNAc bisectora que contienen picos fueron separados en una segunda etapa por una cromatografía de fase inversa (columna RP-18). Mediante esto las estructuras triantenarias + biantenarias + biseccionadas pueden ser distinguidas. El grado de fucosilación de los anticuerpos se determinó por HPLC de aminofase (columna Luna-NH2) de los glicanos marcados con 2-AB. Los picos fueron cuantificados por integración y la estructura de glicano subyacente fue analizada por espectroscopía de masas. Las estructuras fucosiladas y no fucosiladas fueron determinadas y las áreas de pico integradas fueron cuantificadas.

Se analizaron diferentes composiciones moleculares de anticuerpos de Cetuximab, PankoMab y Panko1 expresadas en células NM-F9, GT-2x, NM-H9D8, NM-H9D8-E6 o CHOdhfr-, y los resultados se resumen en las tablas 3 a 4.

Se usaron lectinas que se unen preferentemente a ácidos siálicos enlazados en alfa2-6 (SNA) o alfa2-3 (MAL-I) para caracterizar la sialilación de anticuerpos por análisis ELISA o Western blot. El análisis Western blot se realizó para identificar la cadena pesada diferentemente sialilada de composiciones moleculares de anticuerpos expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Se separaron 5 µg de cada composición molecular de anticuerpo por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas mediante lectinas y/o mediante anticuerpos IgG anti-humanos secundarios. La Figura 10 muestra la cadena pesada diferentemente sialilada de composiciones moleculares de anticuerpos de PankoMab quimérico expresadas en CHOdhfr-, NM-F9 o NM-H9D8 [DSM ACC2806], bien por anticuerpos IgG anti-humanos secundarios (Fig. 10A) o bien SNA (Fig. 10B) que detecta sialilación 2-6. La Figura 11 muestra la cadena pesada diferentemente sialilada de composiciones moleculares de anticuerpos de Cetuximab expresadas en CHOdhfr- o NM-H9D8 visualizadas por unión a SNA.

Se usaron experimentos ELISA para analizar la sialilación de anticuerpos aislados de sobrenadantes de células NM-F9, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6. Anticuerpos purificados de 2 µg/ml en PBS y 50 µl por pocillo se revistieron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp) a 4ºC durante una noche, se bloquearon (PBS/BSA), se lavaron e incubaron durante 1 hora con SNA biotinilado (2 µg/ml, PBS/1%BSA) y se lavaron de nuevo. Después los pocillos se incubaron con POD-estreptavidina, se lavaron y se desarrollaron con TMB. La reacción fue detenida por adición de H_2SO_4 2,5N y la densidad óptica se midió a 450 nm frente a 630 nm como referencia. La Figura 12 muestra que la unión de SNA ocurre para anticuerpos expresados en células NM-H9D8 o NM-H9D8-E6, pero no para anticuerpos expresados en células CHOdhfr- o GT-2x. Las intensidades de unión son diferentes para los anticuerpos individuales, lo que indica un diferente grado de sialilación causado por la fina estructura de los anticuerpos individuales o la disponibilidad de los sacáridos bajo las condiciones usadas.

Los experimentos ELISA se realizaron revistiendo los anticuerpos purificados expresados en las diferentes líneas celulares en pocillos de placas de microtitulación (2 µg/ml, 50 µl por pocillo) y detección por lectinas biotiniladas apropiadas SNA y MAL I. La dependencia de la unión a lectina por sialilación fue comprobada por tratamiento con neuraminidasa (0,1 U/ml e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora). Los resultados para Cetuximab se ilustran en la figura 13A y 13B.

Se realizaron análisis dot blot para identificar diferencias en sialilación de anticuerpos expresados en células CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8 y NM-H9D8-E6. Se pusieron 3 µg de anticuerpos purificados en nitrocelulosa, se bloquearon con PBS/BSA, se lavaron y se visualizaron por SNA, que detecta sialilación 2,6. La figura 14 muestra blots de los anticuerpos quiméricos Panko1 y Panko2 aislados de células CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8 o NM-H9D8-E6. La sialilación 2,6 sólo es detectable en anticuerpos aislados de células NM-H9D8 o NM-H9D8-E6.

Ejemplo 11

Detección de la biodisponibilidad de composiciones moleculares de anticuerpos expresadas en células NM-F9, NM-H9D8 y CHOdhfr-

Se midió una biodisponibilidad más larga en ratones desprovistos de sistema inmune para el anticuerpo sialilado PankoMab expresado en NM-H9D8 en comparación con el anticuerpo no sialilado PankoMab expresado en células NM-F9. se inyectaron por vía intravenosa 5 µg de anticuerpo purificado por ratón para al menos 3 ratones por grupo. Se recogieron muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo después de la inyección (5 minutos, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 144 horas después de la inyección), se aisló el suero y se almacenaron las muestras a -80ºC hasta el análisis. El título de anticuerpos se determinó en estas muestras por ELISA. La figura 15 muestra que el PankoMab quimérico aislado de células NM-H9D8 está disponible más tiempo que el aislado de células NM-F9, lo que es probablemente causado por la diferente sialilación de los anticuerpos.

Ejemplo 12

Clonación de vectores para expresar hFSH en células eucarióticas

Se amplificaron por PCR secuencias codificantes de la cadena FSH alfa y FSH beta con cebadores específicos usando los clones BAC RZPDB737B122053D (genómico FSHalfa), IRAUp969E0752D (ADNc FSHalfa) y RZPDB737H0619D6 (genómico FSHbeta) obtenidos del RZPD, Alemania.

Cebadores para la cadena FSH alfa:

FSHa-wt-f-KpnI: AAAGGTACCATGGATTACTACAGAAAATATG /

FSHa-b-BamHI: AAAGGATCCTTAAGATTTGTGATAATAAC;

Cebadores para la cadena FSH beta:

FSHb-wt-f-HindIII: TTTAAGCTTATGAAGACACTCCAGTTTTTC /

FSHb-b-BamHI: TTTGGATCCTTATTCTTTCATTTCACC

Después de la amplificación los productos fueron clonados por medio de HindIII/BamHI (FSHgenómicobeta) y KpnI/BamHI (FSHgenómicoalfa o FSHcADNalfa) en el correspondiente vector de expresión eucariótico. Se produjo una secuencia de ADNc por Genesíntesis que codificaba para la cadena FSH beta fusionada a una secuencia TSR-leader y clonada en el vector de expresión eucariótico (FSHADNcbeta).

Secuencia FSHADNcbeta (secuencia de TCR-leader subrayada):

atggcctgccccggcttcctgtgggccctggtgatcagcacctgcctggaattctccatggctaacagctgcgagctgaccaacatcaccatcgccatcgagaaaga
ggaatgccggttctgcatcagcatcaacaccacctggtgcgccggctactcgtacacccgggacctggtgtacaaggaccccgccaggcccaagatccagaaaa
cctgcaccttcaaagaactggtgtacgagaccgtgcgggtgcccggctgcgcccaccacgccgacagcctgtacacctaccccgtggccacccagtgccactgcg
gcaagtgcgacagcgacagcaccgactgcaccgtgaggggcctgggccccagctactgcagcttcggcgagatgaaagagtga

Los vectores de expresión (pEFpuro y pEFdhfrB$_{mutB}$) comprenden promotor EF-1 alfa y potenciador HCMV, origen SV40, señal de poliadenilación, gen de resistencia a puromicina en el vector para la cadena alfa, y el gen de dihidrofolasa murino (dhfr) para expresión celular CHO o SEQ ID 1 (Secuencia 1#) para expresión de NM-F9, GT-2x, K562, NM-H9, NM-D4 o NM-H9D8 para selección y amplificación de genes en el vector para la cadena beta.

Ejemplo 13

Transfección de células eucarióticas para expresar hFSH recombinante humano y procedimiento de amplificación de genes para generar clones celulares de alta producción bajo condiciones exentas de suero (GT-2x y NM-H9D8) o condiciones que contienen suero (CHOdhfr-)

Para expresar hFSH en células GT-2x [DSM ACC2858], NM-H9D8 [DSM ACC2806], y CHOdhfr- [ATCC Bo. CRL-9096] fueron co-transfectadas con una mezcla de vectores descritos anteriormente para cadenas alfa y beta (1:1 a 1:3) por lipofección usando DMRIE-C o electroporación (Nucleofector; Amaxa) para las células en suspensión como GT-2x (FSHADNcalfa/FSHgenómicobeta) y NM-H9D8 (FSHADNcalfa/FSHADNcbeta) y lipofectamina o electroporación para la línea celular adherente CHOdhfr- (FSHgenómicoalfa/FSHgenómicobeta). Estas son combinaciones ilustrativas usadas en esta configuración. Cada otra combinación de un plásmido de expresión de cadena hFSH alfa y hFSH beta conduce a resultados comparables.

Dos días después de la transfección, el medio de cultivo fue cambiado a medio de selección (GT-2x y NM-H9D8 en medio X-Vivo20 + 0,75 µg/ml de puromicina + metotrexato 50 nM; CHOdhfr- en DMEM + 10% de FCS dializado + L-glutamina 2 mM + 5 µg/ml de puromicina + metotrexato 50 nM) durante 1 semana. La primera amplificación fue realizada aumentando la concentración de metotrexato a 100 nM durante 2 semanas adicionales y 200 nM de metotrexato durante otras 2 semanas. Parte de la población celular amplificada fue clonada por clonación de célula única en medio sin adición de puromicina y metotrexato. El resto de las células fueron sometidas a una nueva ronda de amplificación de genes aumentando la concentración de metotrexato. De esta manera se realizaron dos a tres rondas de amplificación de genes (100, 200, 500 nM de metotrexato). Adicionalmente, los clones mejores productores identificados por cribado y análisis de clones fueron amplificados más de manera similar.

CHOdhfr-: Se lavaron células de clones crecientes con PBS y se recogieron mediante tratamiento con Acutasa. La mitad de las células resuspendidas fueron sembradas en una placa de ensayo de 96 pocillos, la otra mitad se sembró en una placa de 24 pocillos para cultivo adicional. La placa de ensayo se cultivó durante 20 a 24 h. El sobrenadante de cada pocillo fue analizado en cuanto a título de anticuerpos como se describe en Determinación de tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g) (véase más adelante). La densidad celular relativa se midió usando el ensayo MTT. En detalle, las células fueron incubadas con disolución MTT durante 2 h, la disolución fue descartada y las células lisadas mediante una disolución de HCl 0,04 M en 2-propanol. Después de 2 horas la placa fue mezclada moderadamente y medida usando un fotómetro de placas de microtitulación con filtro de

570 nm en modo dual frente a filtro de referencia de 630 nm.

GT-2x y NM-F9: se centrifugaron placas de 96 pocillos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 200 µl de medio fresco. La mitad de las células resuspendidas se sembraron en una placa de ensayo de 96 pocillos y diluidas con 100 µl de medio, la otra mitad permanece en las placas de clonación para cultivo adicional. Después de 2 días de cultivo, la placa de ensayo fue centrifugada y se analizaron 20 µl de sobrenadante en cuanto a título de anticuerpos como se describe en Determinación de tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g) (véase más adelante). La densidad celular relativa se midió usando el ensayo WST-1 por adición de 10 µl de disolución WST-1 (Roche) en cada pocillo. Después de 1 a 3 horas de incubación la medida se realizó usando un fotómetro de placas de microtitulación con filtro de 450 nm en modo dual frente a filtro de referencia de 630 nm.

Determinación de la tasa de productividad específica (SPR) y tiempo de doblado (g)

Para cada clon, se sembraron $2x10P^{4P}$ por pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en 500 µl de medio de crecimiento. Se dejaron crecer las células durante 3 días, se recogieron en medio condicionado para análisis, y las células fueron retiradas si era necesario mediante Acutasa y contadas. Los títulos de anticuerpo específico fueron determinados cuantitativamente a partir de muestras de medios por ELISA. Las placas de ensayo fueron revestidas con un mAB de ratón específico a hFSFH beta (ab22473). La hFSH recombinante unida se incubó con anticuerpo policlonal de cabra específico a hCG alfa (ab20712) y se detectó con IgG anticabra de mono H+L- POD (Jackson Immuno Cat. No 305-035-003). Para la cuantificación, se usó hFSH recombinante purificada como patrón.

La SPR medida en picogramos de proteína específica por célula por día (pcd) es función tanto de la velocidad de crecimiento como la productividad, y se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$SPR = \frac{\text{masa de proteína total}}{\text{área celular integral (ICA)}}$$

$$ICA = \frac{\text{(número de células final - número de células inicial) x días en cultivo}}{\text{Log BeB (número de células final / número de células inicial)}}$$

El tiempo de doblado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$g = \log 2x \text{ (horas en cultivo)} / \log \text{ (número de células final - número de células inicial)}$$

Determinación del rendimiento medio y rendimiento máximo para las líneas celulares

Después de la clonación de célula única en placas de 96 pocillos usando dilución limitada (0,5 células por pocillo) como se describe anteriormente, de 200 clones únicos puestos teóricamente en placa, se determina la SPR para clones celulares crecientes y se determina la media y desviación, así como el rendimiento máximo para las diferentes líneas celulares y diferentes condiciones. La Tabla 7 y Tabla 8 compara los datos de clones celulares productores de hFSH de CHOdhfr-, GT-2x y NM-H9D8 desarrollados bajo condiciones que contienen suero (CHOdhfr-) y condiciones exentas de suero (GT-2x y NM-H9D8).

Ejemplo 14

Aislamiento de composición molecular de hFSH

Para la producción y aislamiento de una composición molecular de hFSH, las células transfectadas de manera estable que secretan hFSH fueron cultivadas en medio exento de suero hasta que se alcanzó una densidad celular de aproximadamente 1 a 2 x $10P^{6P}$ células/ml. Después de la retirada de las células del sobrenadante del cultivo celular por centrifugación (400 x g, 15 min), el anticuerpo quimérico fue purificado comprendiendo cromatografía de afinidad usando un anticuerpo policlonal para hCGalfa acoplado a una columna activada con NHS (HiTrap NHS-activated HP; GE Healthcare). La fracción FSH purificada eluida por cambio repentino en pH fue vuelta a amortiguar en PBS y concentrada usando tubos de centrífuga CentriPrep (corte 10 kDa, Millipore) y analizada por SDS-PAGE (véase la Fig. 16).

Ejemplo 15

Determinación de la actividad de composiciones moleculares de FSH

La actividad de moléculas de FSH que llevan un patrón de glicosilación diferente puede ser determinada según los métodos descritos posteriormente. Para seleccionar una línea celular adecuada con el método de cribado, que proporcione una glicosilación optimizada, se expresa la molécula de FSH en diferentes líneas celulares, obteniendo

de este modo composiciones de FSH de las líneas celulares individuales que presentan un patrón de glicosilación divergente con respecto a p.ej. el grado de sialilación, galactosilación y/o grado de fucosilación. La molécula/composición de FSH que tiene la actividad más favorable y por tanto patrón de glicosilación puede ser determinada por al menos uno de los siguientes métodos:

Ensayo de células de granulosa de rata:

Se obtuvieron células de granulosa de ratas hipofisectomizadas tratadas con DES. El método para la preparación de las células es descrito en detalle por Jia y Hsueh 1985.

Las células obtenidas fueron cultivadas en una escala de 24 pocillos con -160000 células/pocillo en medio de McCoy 5ª que contenía DES 100 nM, 1-metil-3-isobutilxantina 0,125 M, Glutamina 2 mM, androstenodiona 1 µM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, 1 µg/ml de insulina bovina y concentraciones crecientes de preparaciones de rFSH derivadas de células GT-2x y NM-H9D8 (0-1 µg/ml) durante hasta 72 horas. Los medios fueron recogidos 72 h después de la incubación y almacenados a -20ºC hasta la cuantificación de estradiol por ELISA (Calbiotech # ES071 S).

Ensayo de 293HEK:

Células HEK293 transfectadas de manera estable con el receptor hFSH ($2x10^5$ células/ plato de cultivo de 35 mm) fueron expuestas a dosis crecientes de cada composición molecular de proteína de FSH obtenida de células GT-2x y NM-H9D8 durante 24 h en el intervalo de 0-1 µg/ml de FSH en presencia de 1-metil-3-isobutilxantina 0,125 mM durante 24 h a 37ºC durante hasta 72 horas. Después de la incubación, las concentraciones totales (intra- y extracelulares) de cAMP fueron determinadas por el cAMP Direct Biotrak™ EIA (GE Healthcare, Cat.no.: RPN225) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de células GFSHR-17:

Las células fueron cultivadas con medio Eagle modificado con Dulbecco Ham F12 (1:1 v:v; Biochrom KG, Berlín, Alemania) que contenía 5% de suero de ternero fetal (Biochrom KG, Berlín, Alemania). Las células fueron llevadas a placa con $2x10^5$ células/placa de 24 pocillos e incubadas con las composiciones moleculares de proteína FSH obtenidas de GT-2x y NM-H9D8 durante 24 h a un intervalo de 0,1 µg/ml durante 1-24 horas. Los medios fueron recogidos después de la incubación y almacenados a -20ºC hasta la cuantificación de progesterona usando un ensayo ELISA de progesterona (Biochem Immunosystems, Freiburg, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de células de granulosa humana:

Células de granulosa-luteína de aspirados foliculares, obtenidos de mujeres que participaron en un programa de fertilización in vitro en la Universidad de Münster, fueron enriquecidas como describe Khan et al., 1990, y sembradas en placas de 6 pocillos ()1-1,5 x 10^5 células viables por pocillo). Las células fueron incubadas a 37ºC en HAM F12/medio esencial modificado con Dulbecco (DMEM) (1:1, ICN Biomedicals, Meckenheim, Alemania) suplementado con 10% de suero de ternero fetal inactivado con calor (FCS; Gibco, Eggenstein, Alemania), penicilina (50 unidades/ml), estreptomicina (50 pg/ml), gentamicina (100 pg/ml) y anfotericina (0,6 pg/ml) en una atmósfera de 5% de CO_2. Las células fueron expuestas a dosis crecientes de cada composición molecular de proteína de FSH obtenida de células GT-2x y NM-H9D8 durante 24 h en el intervalo de 0-1 µg/ml de FSH en presencia de 1-metil-3-isobutilxantina 0,125 mM durante 24 h a 37ºC durante hasta 72 horas. Después de la incubación, las concentraciones totales (intra- y extracelulares) de cAMP fueron determinadas por el cAMP Direct Biotrak™ EIA (GE Healthcare, Cat.no.: RPN225) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 16

Análisis de glicanos de composiciones de FSH expresadas en células GT-2x y CHOdhfr-

Se realizó análisis Western blot para identificar las composiciones moleculares de FSH diferentemente sialiladas expresadas en células CHOdhfr-, GT-2x [DSM ACC2858] o NM-H9D8 [DSM ACC2806]. 5 µg de cada composición molecular de anticuerpo por SDS-Page en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y visualizadas por SNA (Fig. 17) que detecta sialilación 2-6.

Se puede realizar un análisis de glicanos detallado según el ejemplo 10 para la determinación del contenido de ácido siálico, distribución de carga, contenido de fucosa, estado de galactosilación y contenido de GlcNAc bisectora.

Definiciones según recomendaciones de IUPAC-IUBMB (1996):

Neu5Gc: ácido 5-N-glicolil-α-neuramínico

Neu5Ac y NeuNAc: ácido 5-N-acetil-α-neuramínico

Gala1,3Gal: sacárido α-D-galactopiranosil-(1→3)-galactopiranosil-adyacente

Ácido neuramínico enlazado en 2,3: sacárido 5-N-acetil-α-neuraminil-(2→3)-galactopiranosil-adyacente

Ácido neuramínico enlazado en 2,6: sacárido 5-N-acetil-α-neuraminil-(2→6)-galactopiranosil-adyacente

Es de entender que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y/o reactivos particulares descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. Es de entender también que la terminología usada en la presente memoria es para el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada sólo por las reivindicaciones adjuntas.

SEQ ID:

Secuencia #1

SEQ ID 1

MVRPLNCIVAVSQDMGIGKNGDLPWPPLRNEWKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLS
RELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLG
KYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKD

Secuencia #2

SEQ ID 2

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNESRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #3

SEQ ID 3

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEARYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #4

SEQ ID 4

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEGRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #5

SEQ ID 5

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #6

SEQ ID 6

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #7

SEQ ID 7

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS
RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE
KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

Secuencia #8

SEQ ID 8

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSR
ELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGK
YKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKD

Secuencia #9

SEQ ID 9

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSR
ELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGK
YKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKD

Secuencia #10

SEQ ID 10

MWLGSLLLLGTVACSISA

Tabla 1

	CHOdhfr-	**NM-F9**
Tasa de producción (clgG1) pcd determinada después de la 1ª a 4ª ronda de amplificación de genes (metotrexato) y clonación celular única de 200 clones sembrados teóricamente (dilución limitada)	1ª ronda (MTX 100 nM) Media: 2 +/- 1 pcd; Max: 3 pcd 2ª ronda (MTX 200 nM) Media: 5 +/- 1 pcd; Max: 7 pcd 3ª ronda (MTX 500 nM) Media: 9 +/- 5 pcd; Max: 17 pcd 4ª ronda (MTX 1000 nM) Media: 13 +/- 5 pcd; Max: 22 pcd	1ª ronda (MTX 100 nM) Media: 5 +/- 1,5 pcd; Max: 13 pcd 2ª ronda (MTX 200 nM) Media: 7,5 +/- 4,5 pcd; Max: 19 pcd 3ª ronda (MTX 500 nM) Media: 12,5 +/- 4,5 pcd; Max: 19 pcd 4ª ronda (MTX 1000 nM) Media: 16,5 +/- 6 pcd; Max: 27 pcd

Tabla 2

	NM-H9D8
Tasa de producción (clgG1) pcd determinada después de la 1ª a 5ª ronda de amplificación de genes (metotrexato) y clonación celular única de 200 clones sembrados teóricamente (dilución limitada)	1ª ronda (MTX 100 nM) Media: 7 +/- 4 pcd; Max: 14 pcd 2ª ronda (MTX 200 nM) Media: 14 +/- 4 pcd; Max: 23 pcd 3ª ronda (MTX 500 nM) Media: 13 +/- 6 pcd; Max: 31 pcd 4ª ronda (MTX 1000 nM) Media: 23 +/- 8 pcd; Max: 34 pcd 5ª ronda (MTX 2000 nM) Media: 23 +/- 9 pcd; Max: 38 pcd

Tabla 3

	pmol Neu5Gc	pmol Neu5Ac	pmol NeuSGc / µg proteína	pmol NeuSAc / µg proteína
Erbitux (Merck; SP2/0)	0,149	0,000	**1,784**	0,000
Cetuximab GT-2x	0,000	0,278	0,000	**3,335**
Ceruximab NM-H9D8	0,000	1,156	0,000	**12,003**
cPankoMab CHOdhfr-	0,000	0,477	0,000	**4,921**
cPankoMab GT-2x	0,000	0,248	0,000	**2,990**
cPankoMab NM-H9D8	0,000	0,776	0,000	**13,856**

Tabla 4

	A0	A1	A2	A3	A4
Panko1 CHOdhfr-	75	9	11	4	1
Panko1 NM-H9D8	43	14	32	10	1
Panko1 NM-H9D8-E6	40	16	33	10	1
c-PankoMab CHOdhfr-	93	7	0	0	0
c-PankoMab NM-F9	99	1	0	0	0
c-PankoMab NM-H9D8	62	26	11	1	0

Tabla 5

	G0 [%]	G1 [%]	G2 [%]	G3 [%]
Panko1 CHOdhfr-	22	45	33	0
Panko1 NM-H9D8	7	8	66	14
Panko1 NM-H9D8-E6	5	18	58	19
cPankoMab CHOdhfr-	28	36	35	1
cPankoMab NM-F9	7	26	65	2
cPankoMab NM-H9D8	7	32	59	0

Tabla 6

	fucosilado	no fucosilado	GlcNAc biantenaria + bisectora
Panko1 CHOdhfr-	100	0	0
Panko1 NM-H9D8	45	55	5
Panko1 NM-H9D8-E6	21	79	2

	biantenario	GlcNAc biantenaria + bisectora	no fucosilado
cPankoMab CHO	99	0	0
cPankoMab NM-F9	68	29	6
cPankoMab NM-H9D8	59	39	1

Tabla 7

	CHOdhfr-	**GT-2X**
Tasa de producción (FSH)	3ª ronda (MTX 500 nM)	2ª ronda (MTX 200 nM)
pcd determinada después de la 3ª ronda de amplificación de genes (metotrexato) y clonación celular única de 200 clones sembrados teóricamente (dilución limitada)	Media: <1 pcd; Max: 0,05 pcd	Media: 2,5 +/- 2,0 pcd; Max: 6 pcd 3ª ronda (MTX 500 nM) Media: 2,5 +/- 1,3 pcd; Max: 12 pcd

Tabla 8

	NM-H9D8
Tasa de producción (FSH) pcd determinada después de la 3ª ronda de amplificación de genes (metotrexato) y clonación celular única de 200 clones sembrados teóricamente (dilución limitada)	2ª ronda (MTX 200 nM) Media: 2,2+/- 1,2 pcd; Max: 4 pcd

Tabla 9

- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - afinidad más alta - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - afinidad más alta - alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - afinidad más alta - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes

- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes
- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc

- alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- alta Actividad, en particular actividad Fc - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc	- No NeuGc	- No NeuGc
- No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - bisecGlcNAc - alta Actividad - 6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - alta Actividad, en particular actividad Fc - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc	- No NeuGc	- No NeuGc

– No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – alto rendimiento – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Alta Galactosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable
– Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – afinidad más alta – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – afinidad más alta – alto rendimiento – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – afinidad más alta – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc

– alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– alto rendimiento – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – Baja Fucosa como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – alto rendimiento – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – 2-6 NeuNAc – 2-3 NeuNAc – más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable – bisecGlcNAc – alta Actividad, en particular actividad Fc – 2-6 NeuNAc
– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable	– No NeuGc – No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable
– bisecGlcNAc	– bisecGlcNAc	– bisecGlcNAc

- alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- alto rendimiento - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alta Actividad, en particular actividad Fc - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alta Actividad, en particular actividad Fc - 2-6 NeuNAc
- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - más ácido siálico como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alto rendimiento - ácido siálico bajo como se define en la reivindicación 2 y reivindicaciones dependientes	- No NeuGc - No Galalfa 1-3 Gal terminal detectable - alto rendimiento - 2-6 NeuNAc

Tabla 10

Panko1

Fuc neg + BisGlcNAc neg.	H9D8 = 54%	H9D8-E6 = 79%
Fuc pos + BisGlcNAc pos	H9D8 = 5%	H9D8-E6 = 2%
Fuc neg + BisGlcNAc pos	H9D8 = 0%	H9D8-E6 = 0%

Panko2

Fuc neg + BisGlcNAc neg.	H9D8 = ~0%	F9 y GT-2X = ~5-6%
Fuc pos + BisGlcNAc pos	H9D8 = 36%	F9 y GT-2X = 29%
Fuc neg + BisGlcNAc pos	H9D8 = 0%	F9 y GT-2X = 0%

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición molecular de proteína, que comprende

(a) introducir en una célula huésped que es una célula sanguínea humana inmortalizada al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicha proteína; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de proteína; y

(c) aislar dicha composición molecular de proteína.

en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en DSM ACC2858 (GT-2X), DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de las mismas.

en donde la célula o línea celular derivada de DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6) o DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) es capaz de producir una composición de molécula proteica que

- no comprende NeuGc detectable;
- comprende NeuNAc enlazado en α2,6; y
- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula proteica de las moléculas proteicas en dicha composición de molécula proteica que es al menos 15% mayor en comparación con la misma cantidad de moléculas proteicas en al menos una composición de molécula proteica de la misma molécula proteica aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

2. El método según la reivindicación 1 para producir una composición molecular de proteína, preferiblemente una composición molecular de anticuerpo, en donde dicha célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación:

(i) no comprende NeuGc detectable; y/o

(ii) tiene un grado de galactosilación en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que está aumentado en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iii) tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iv) tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(v) no comprende Galalfa1-3Gal terminal detectable; y/o

(vi) comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(vii) comprende al menos una estructura de carbohidrato que contiene GlcNAc bisectora; y/o

(viii) tiene un patrón de sialilación que está alterado en comparación con el patrón de sialilación de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma,

y en donde las moléculas de proteína tienen al menos una de las características de glicosilación (i) a (viii).

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho patrón de sialilación está caracterizado por al menos una de las siguientes características:

- comprende NeuNAc enlazado en alfa2-6; y/o

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína de dichas moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

- comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente más cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

4. El método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha célula huésped se selecciona para producir una glicoproteína, que comprende

a) al menos 10% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína, que carece de fucosa; y/o

b) al menos 2% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que contiene GlcNAc bisectora; y/o

c) más que 35% de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína en dicha composición molecular de proteína; y/o

d) comprende menos que 22% de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína en dicha composición molecular de proteína.

5. El método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición molecular de proteína producida tiene al menos una de las siguientes características:

- tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado, en particular en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

- tiene una homogeneidad mejorada, en particular en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

- tiene un rendimiento medio o máximo aumentado que es al menos 10% más alto que el rendimiento de al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene una homogeneidad mejorada, que es una homogeneidad de glicosilación mejorada en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

- tiene una actividad aumentada en comparación con al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

- en caso de que dicha molécula de proteína sea una molécula de anticuerpo, tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- en caso de que dicha molécula de proteína sea una molécula de anticuerpo, tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 15%, preferiblemente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% y preferiblemente 50% más alta que la unión de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-).

6. El método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula huésped se selecciona para producir una composición de proteína que comprende moléculas de proteína que tienen las siguientes combinaciones de glicosilación características:

(a)

- no comprende NeuGc detectable

- no comprende Galalfa1-3Gal detectable

- comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2

- tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2

- comprende bisecGlcNAc

- comprende una cantidad aumentada de ácido siálico en comparación con una composición de proteína de la misma molécula de proteína cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) o en comparación a una línea celular deficiente en sialilación tal como DSM ACC2606 (NM-F9) y DSM ACC2605 (NM-D4); o

(b)

- no comprende NeuGc detectable

- no comprende Galalfa1-3Gal detectable

- comprende un patrón de galactosilación como se define en la reivindicación 2

- tiene un contenido de fucosa como se define en la reivindicación 2

- comprende bisecGlcNAc

- comprende 2-6 NeuNAc

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en el grupo de citocinas y sus receptores, tales como los factores de necrosis tumoral THF-alfa y TNF-beta; renina; hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A y cadena B de la insulina; gonadotrofinas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteneizante (LH), tirotrofina, y gonadotrofina coriónica humana (hCG); calcitonina; glucagón; factores de la coagulación tales como factor VIIIC, factor IX, factor VII, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores del plasminógeno, tales como urocinasa, activador del plasminógeno de orina humana y de tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos humanos; una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A y cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A y D; factores reumatoides; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, neurotrofina-5, neurotrofina-6 y factor beta del crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento transformante tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y Ii; proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso; un interferón tal como interferón-alfa, -beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), tales como IL-1 a IL-12; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la degradación; anticuerpos e inmunoadhesinas; glicoforina A; MUC1.

8. El método según la reivindicación 7, en donde la proteína es hormona estimulante del folículo (FSH).

9. El método según la reivindicación 8, en donde la proteína es hormona estimulante del folículo (FSH) y en donde la célula huésped es DSM ACC 2806 (NM-H9D8).

10. El método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.

11. El método según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos contra gangliósido GD3, anticuerpos contra cadena alfa del receptor de interleucina-5 humana, anticuerpos contra HER2, anticuerpos contra quimiocina CC receptora 4, anticuerpos contra CD20, anticuerpos

contra CD22, anticuerpos contra neuroblastoma, anticuerpos contra MUC1, anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico; en particular un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PankoMab, Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptin, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, OKT3, anticuerpo KM2160 anti-quimiocina CC receptora 4, y anticuerpo chCE7 anti-neuroblastoma.

12. El método según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo contra MUC1; un anticuerpo contra HER2; y un anticuerpo contra EGFR.

13. El método según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es Cetuximab o una variante del mismo, que se une al mismo epítopo que Cetuximab.

14. El método según la reivindicación 13, en donde el anticuerpo es Cetuximab y en donde la célula huésped es DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12).

15. El método según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es Pankomab o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo de TA-MUC1 que PankoMab.

16. El método según la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es Pankomab y en donde la célula huésped es DSM ACC 2806 (NM-H9D8).

17. El método según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es Herceptin.

18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde dicha proteína

(i) está fusionada a otra secuencia de péptido o polipéptido tal como un enlazador, una molécula activadora o una toxina; o

(ii) es un fragmento de anticuerpo fusionado a otra secuencia de proteína, en particular una secuencia de proteína seleccionada del grupo que consiste en citocinas, factores co-estimulatorios, toxinas, fragmentos de anticuerpo de otros anticuerpos, secuencias de multimerización, y secuencias para la detección, purificación, secreción o estabilización tales como etiquetas, señales de localización o enlazadores; o

(iii) es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo acoplado a una molécula efectora que media un efecto terapéutico, tal como una molécula efectora inmune, una toxina o un radioisótopo.

19. Una composición molecular de anticuerpo obtenible por un método de producción que comprende las etapas de

(a) introducir en una célula huésped de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicho anticuerpo; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo; y

(c) aislar dicha composición molecular de anticuerpo;

en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6) y DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12); y

en donde la composición molecular de anticuerpo

- no comprende NeuGc detectable;

- comprende NeuNAc enlazado en α2,6; y

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y

en donde el anticuerpo es un anticuerpo entero terapéutico.

20. La composición molecular de anticuerpo según la reivindicación 19, en donde la composición molecular de anticuerpo comprende al menos 2%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10% y lo más preferiblemente al menos 15% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que contiene GlcNAc bisectora.

21. La composición molecular de anticuerpo según la reivindicación 19 o 20, en donde la composición molecular de anticuerpo tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 20%, preferiblemente al menos 30% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

22. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la composición molecular de anticuerpo comprende al menos 50%, preferiblemente al menos 60% y más preferiblemente al menos 70% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo, que carecen de fucosa.

23. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde la composición molecular de anticuerpo tiene un grado más alto de sialilación que el que se alcanza en células DSM ACC2606 (NM-F9) o DSM ACC2605 (NM-D4); en donde las células DSM ACC2606 (NM-F9) y DSM ACC2605 (NM-D4) sólo alcanzan aproximadamente 50% a 60% del grado de sialilación que se obtiene con la célula huésped usada en la etapa (a) del método de producción.

24. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en donde la composición molecular de anticuerpo no comprende Gal*alfa*1-3Gal terminal detectable.

25. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en donde el anticuerpo se selecciona de anticuerpos contra gangliósido GD3, anticuerpos contra cadena alfa del receptor de interleucina-5 humana, anticuerpos contra HER2, anticuerpos contra quimiocina CC receptora 4, anticuerpos contra CD20, anticuerpos contra CD22, anticuerpos contra neuroblastoma, anticuerpos contra MUC1, anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico; en particular un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PankoMab, Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptin, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, OKT3, anticuerpo KM2160 anti-quimiocina CC receptora 4, y anticuerpo chCE7 anti-neuroblastoma.

26. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en donde el anticuerpo es de la clase IgG, preferiblemente un IgG humano, humanizado o quimérico que comprende una región Fc humana.

27. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, que comprende al menos una glicoforma de una molécula de anticuerpo con al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio de la región Fc.

28. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, en donde el anticuerpo tiene al menos un sitio de N-glicosilación que tiene la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr, en donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto Pro, y/o al menos un sitio de O-glicosilación en la secuencia de la región Fab.

29. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28, que comprende

(i) una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida a otro sitio de glicosilación de la molécula de anticuerpo que el aminoácido Asn-297 en el segundo dominio de la parte Fc, en donde la composición de anticuerpo tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida, cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas o seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, CHOdhfr-, BHK, NSO, SP2/0, DSM ACC2606 (NM-F9), DSM ACC2605 (NM-D4), PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas; o

(ii) una molécula de anticuerpo que comprende al menos una cadena de carbohidrato unida al menos a un sitio de N-glicosilación y/o al menos un sitio de O-glicosilación en una secuencia de la región Fab de la molécula de anticuerpo, en donde la composición de anticuerpo tiene una semivida en suero y/o biodisponibilidad extendida, cuando se mide en al menos un mamífero tal como ratones, ratas o seres humanos, que la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de al menos una de las líneas celulares CHO, CHOdhfr-, BHK, NSO, SP2/0, DSM ACC2606 (NM-F9), DSM ACC2605 (NM-D4), PerC.6 o hibridoma de ratón cuando se expresa en las mismas.

30. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 29, en donde el anticuerpo

(i) está fusionado a otra secuencia de péptido o polipéptido tal como un enlazador, una molécula activadora o una

toxina; o

(ii) está acoplado a una molécula efectora que media un efecto terapéutico, tal como una molécula efectora inmune, una toxina o un radioisótopo.

31. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, en donde dicha composición tiene al menos una de las siguientes características:

- tiene un grado de galactosilación de galactosa, que está enlazada a GlcNAc, en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio particular de glicosilación de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo, que está aumentado en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

- tiene una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 5% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

- tiene una cantidad de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 5% más baja en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

- comprende una cantidad de fucosa en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 5% menos en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

- comprende al menos 20% de cadenas de carbohidrato enlazadas N-glicosídicamente más cargadas de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma, y/o

- comprende más que 35% de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo; y/o

- comprende menos que 22% de estructuras G0 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo; y/o

- tiene una actividad aumentada y/o rendimiento aumentado en comparación con al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene una homogeneidad mejorada en comparación con al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene una actividad aumentada que es al menos 10% más alta que la actividad de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene una unión mediada por antígeno o mediada por Fc aumentada que es al menos 50% más alta que la unión de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

- tiene actividad ADCC y/o CDC.

32. La composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31, en donde dicha

molécula de anticuerpo reconoce cáncer, tumor o metástasis, o al menos una célula de cáncer o célula de tumor en al menos un ser humano.

33. La composición molecular de anticuerpo según al menos una de las reivindicaciones 19 a 32, en donde dicha composición comprende al menos una molécula de anticuerpo, que tiene una o más de las siguientes características:

a) se une a un epítopo de MUC1, que comprende la secuencia de aminoácidos DTR de la región de repetición tándem extracelular; y/o

b) el anticuerpo según (a) que se une al epítopo TA-MUC1, que comprende la secuencia de aminoácidos DTR, en donde la T está glicosilada; y/o

c) el anticuerpo según (b) que se une al epítopo glicosilado con una afinidad más alta que el epítopo no glicosilado; y/o

d) el anticuerpo según (b) o (c) que se selecciona de

- el anticuerpo PankoMab o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que PankoMab;

- el anticuerpo Panko1 o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que Panko1;

- el anticuerpo Panko2 o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que Panko2.

34. La composición molecular de anticuerpo según una de las reivindicaciones 19 a 33, en donde dicho anticuerpo tiene un grado de galactosilación más alto con al menos una cantidad 5% más alta de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que la misma cantidad de moléculas de anticuerpo de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

35. La composición molecular de anticuerpo según una de las reivindicaciones 19 a 34, en donde el patrón de glicosilación da como resultado el siguiente patrón de actividad:

(a) una actividad CDC que es más que 15% más alta que la actividad del mismo anticuerpo expresado en células CHO;

(b) una semivida en suero que está alargada en un factor 2 en comparación con un anticuerpo que no lleva o lleva un grado bajo de sialilación detectable;

(c) tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada que es al menos 2 veces más alta que la citotoxicidad celular mediada por Fc de al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo cuando se expresa en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-).

36. La composición molecular de anticuerpo según al menos una de las reivindicaciones 19 a 35, en donde dicho anticuerpo se selecciona del siguiente grupo que consiste en:

(a) el anticuerpo PankoMab o una variante del mismo, que tiene

(i) una actividad ADCC aumentada que es al menos 3 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

(ii) una actividad CDC aumentada que es al menos 20%, preferiblemente 30% o 40% más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

(iii) 2-6 NeuNAc detectable; y/o

(iv) una semivida en suero prolongada en comparación con una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de NM-F cuando se expresa en la misma; y/o

(v) una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 50% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la

misma; y/o

(vi) una cantidad de estructuras GlcNac bisectoras en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 20% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

en donde dicha composición molecular de PankoMab es obtenible en un rendimiento más alto produciéndola en la célula huésped DSM ACC 2806 (NM-H9D8) en comparación con una composición molecular de PankoMab aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

(b) el anticuerpo Panko2 o una variante del mismo, que tiene

(i) una actividad ADCC aumentada que es al menos 4 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

(ii) 2-6 NeuNAc detectable y/o

(iii) una actividad de unión a antígenos más alta que es al menos 30%, preferiblemente 40% o 50% más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-);

en donde dicha composición molecular de Panko2 es obtenible produciéndola en la célula huésped DSM ACC 2806 (NM-H9D8);

(c) el anticuerpo Panko1 o una variante del mismo, que tiene

(i) una actividad ADCC aumentada que es al menos 8 veces más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

(ii) una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 50% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iii) una cantidad más alta de estructuras no fucosiladas en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 70% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma;

en donde dicha composición molecular de Panko1 es obtenible produciéndola en la célula huésped DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6);

(d) el anticuerpo Panko1 o una variante del mismo, que tiene

(i) una actividad ADCC aumentada que es al menos 50% más alta que la actividad de la composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo expresada en la línea celular ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-); y/o

(ii) una cantidad de estructuras G2 en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 50% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y/o

(iii) una cantidad más alta de estructuras no fucosiladas en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 50% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se

expresa en la misma;

en donde dicha composición molecular de Panko1 es obtenible produciéndola en la célula huésped DSM ACC 2806 (NM-H9D8).

37. La composición molecular de anticuerpo según al menos una de las reivindicaciones 19 a 31, 34 y 35, en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra HER2, o contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

38. La composición molecular de anticuerpo según la reivindicación 37, en donde el anticuerpo es cetuximab o una variante del mismo, que se une al mismo epítopo que cetuximab, o herceptin.

39. Una célula sanguínea humana inmortalizada seleccionada del grupo que consiste en DSM ACC2858 (GT-2X), DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de la misma;

en donde la célula o línea celular derivada de DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6) o DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) es capaz de producir una composición molecular de proteína que:

- no comprende NeuGc detectable;

- comprende NeuNAc enlazada en α2,6; y

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de proteína de las moléculas de proteína en dicha composición molecular de proteína que es al menos 15% más alta en comparación con la misma cantidad de moléculas de proteína en al menos una composición molecular de proteína de la misma molécula de proteína aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma.

40. Uso de una célula sanguínea humana inmortalizada según una la reivindicación 39, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una molécula de proteína o al menos una parte de la misma en un vector de expresión apropiado para producir dicha proteína o dicha parte de la misma.

41. Un método para producir una composición molecular de anticuerpo, que comprende

(a) introducir en una célula huésped que es una célula sanguínea humana inmortalizada de origen leucémico mieloide humano al menos un ácido nucleico que codifica al menos una parte de dicho anticuerpo; y

(b) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la producción de dicha composición molecular de anticuerpo; y

(c) aislar dicha composición molecular de anticuerpo.

en donde la célula huésped se selecciona para producir una composición molecular de anticuerpo que tiene las siguientes características de glicosilación:

- no comprende NeuGc detectable;

- comprende NeuAc enlazada en α-2,6; y

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular del anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 15% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de ATCC No. CRL-9096 (CHOdhfr-) cuando se expresa en la misma; y

en donde el anticuerpo es un anticuerpo entero terapéutico.

42. El método según la reivindicación 41, en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en DSM ACC 2806 (NM-H9D8), DSM ACC 2807 (NM-H9D8-E6), DSM ACC 2856 (NM-H9D8-E6Q12) o una célula o línea celular derivada de las mismas.

43. El método según la reivindicación 41 o 42, en donde la célula huésped se selecciona para producir una composición molecular de anticuerpo que tiene al menos una de las siguientes características de glicosilación adicionales:

- comprende al menos 2%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10% y lo más preferiblemente al menos 15% de estructuras de carbohidrato en las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que contiene GlcNAc bisectora;

- tiene un grado de sialilación aumentado con una cantidad de NeuNAc en las estructuras de carbohidrato totales o en las estructuras de carbohidrato en un sitio de glicosilación particular de la molécula de anticuerpo de dichas moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo que es al menos 20%, preferiblemente al menos 30% más alto en comparación con la misma cantidad de moléculas de anticuerpo en al menos una composición molecular de anticuerpo de la misma molécula de anticuerpo aislada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] cuando se expresa en la misma;

- comprende al menos 50%, preferiblemente al menos 60% y más preferiblemente al menos 70% de estructuras de carbohidrato de las unidades carbohidrato totales o de al menos una cadena de carbohidrato particular en un sitio de glicosilación particular de una molécula de anticuerpo de las moléculas de anticuerpo en dicha composición molecular de anticuerpo, que carecen de fucosa; y/o

- tiene un grado de sialilación más alto que el que se alcanza en células DSM ACC2606 (NM-F9) o DSM ACC2605 (NM-D4); en donde las células DSM ACC2606 (NM-F9) o DSM ACC2605 (NM-D4) sólo alcanzan aproximadamente 50 a 60% del grado de sialilación que se obtiene con la célula huésped usada en la etapa (a) del método de producción.

44. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en

- un anticuerpo contra MUC1

- un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico;

- un anticuerpo contra HER2; Y

- un anticuerpo contra CD20.

45. El método según la reivindicación 44, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en

(i) un anticuerpo que se une al epítopo TA-MUC1 que comprende la secuencia de aminoácidos DTR, en donde la T está glicosilada, y que preferiblemente se une al epítopo glicosilado con una afinidad más alta que el epítopo no glicosilado, y/o preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en

- PankoMab o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que PankoMab;

- Panko1 o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que Panko1; y

- Panko2 o una variante del mismo, que se une competitivamente al mismo epítopo TA-MUC1 que Panko2;

(ii) Cetuximab o una variante del mismo, que se une al mismo epítopo que Cetuximab;

(iii) Herceptin; y

(iv) Rituximab.

46. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45, en donde dicha célula huésped se selecciona para producir una composición molecular de anticuerpo que tiene al menos una de las características según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

47. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para producir una composición molecular de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 38.

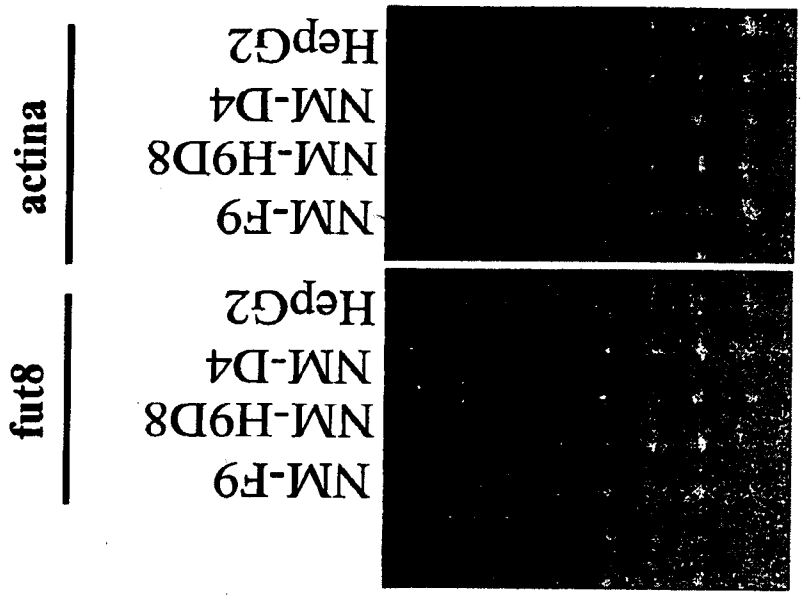


Fig. 1

Fig. 2

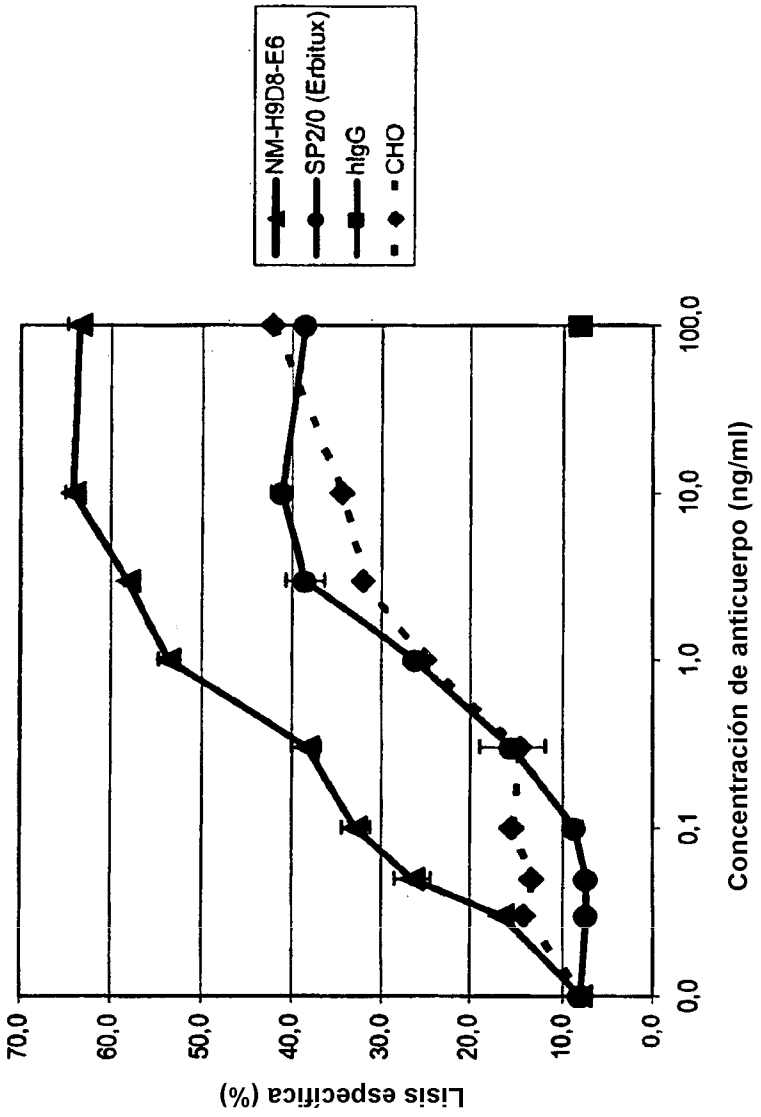
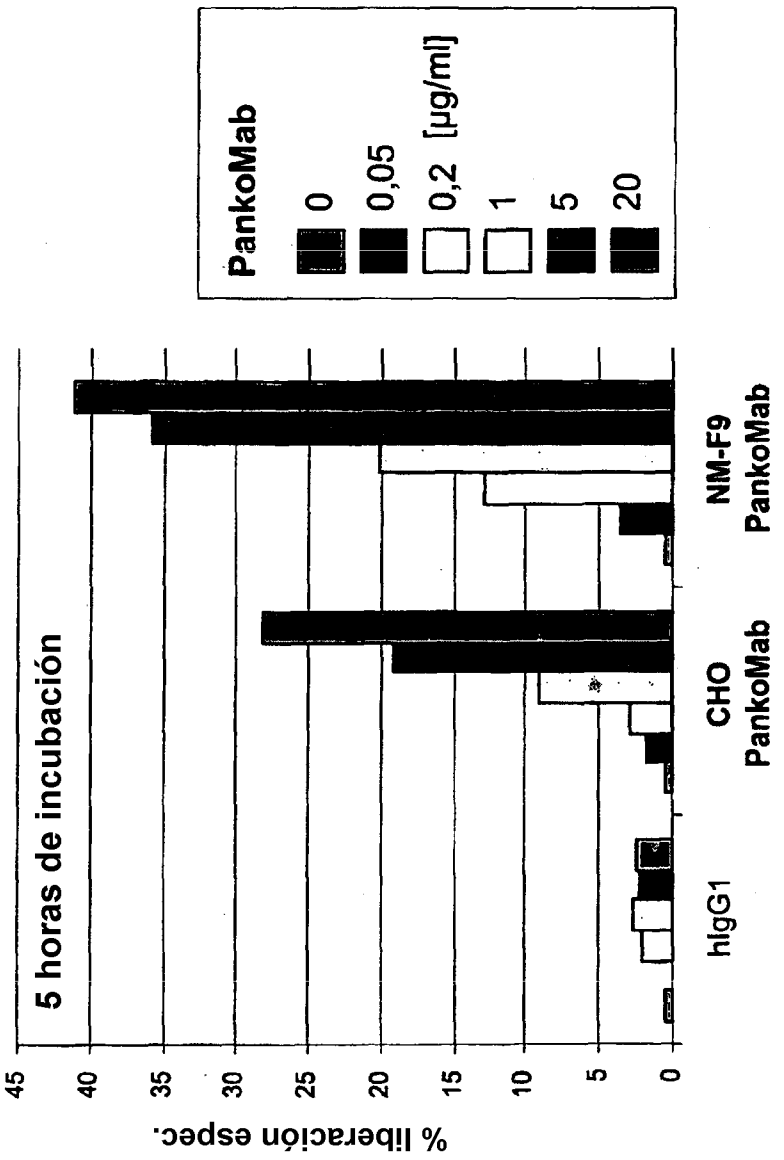
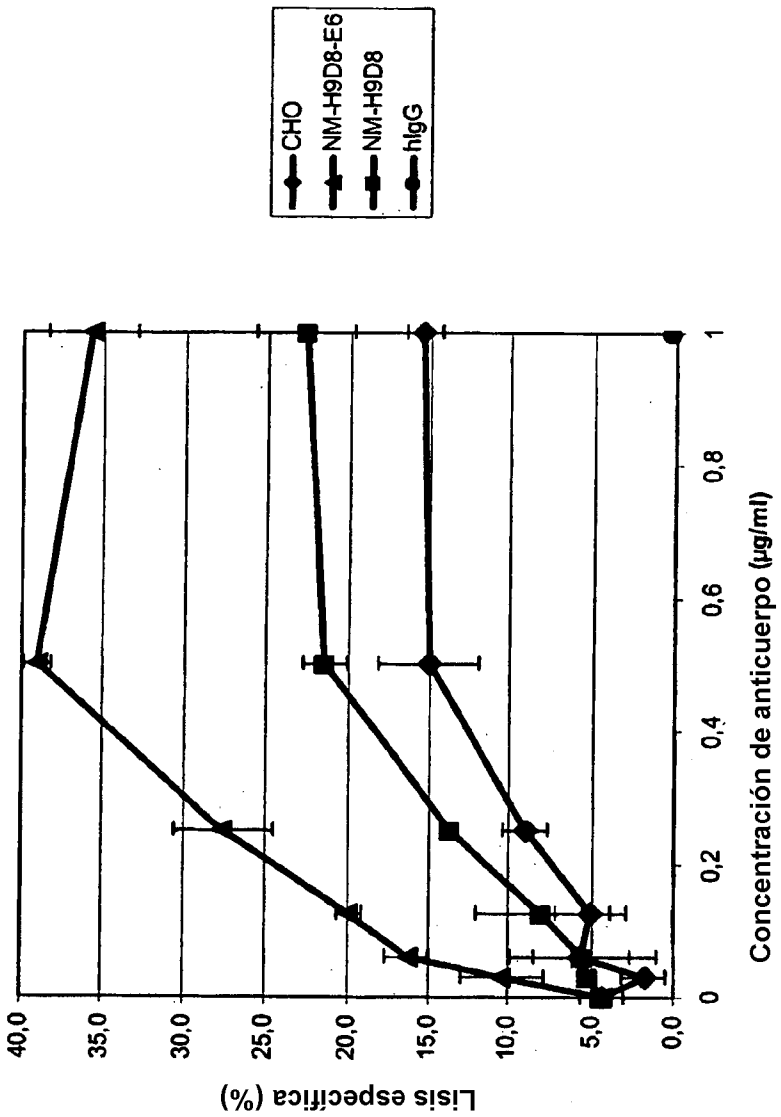

NM-H9D8-E6
SP2/0 (Erbitux)
hIgG
CHO
Lisis especifica (%)
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
0,0
0,1
1,0
10,0
100,0
Concentración de anticuerpo (ng/ml)

Fig. 3



lisis mediada por ADCC de células tumorales cargadas con Eu^{3+}; relación célula diana / efectora (ZR75-1 / PBMC) 1:100

Fig. 4


CHO
NM-H9D8-E6
NM-H9D8
hIgG
Lisis específica (%)
40,0
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
Concentración de anticuerpo (µg/ml)

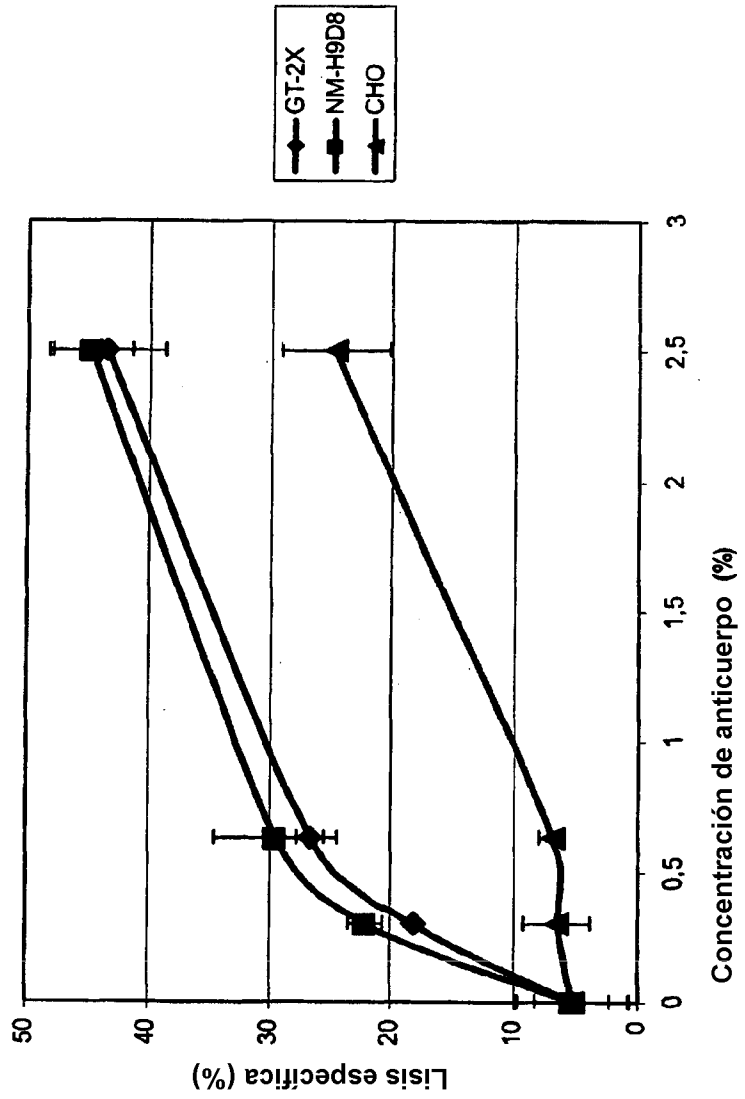

GT-2X
NM-H9D8
CHO
Lisis especifica (%)
Concentración de anticuerpo (%)
0
10
20
30
40
50
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3

Fig. 5

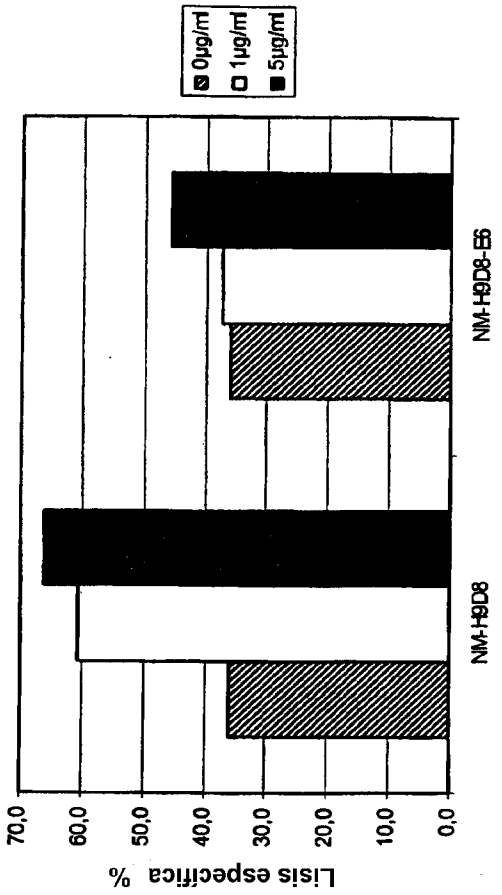

0µg/ml
1µg/ml
5µg/ml
NM-H9D8-E6
NM-H9D8
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
Lisis especifica %

Fig. 6

Fig. 7

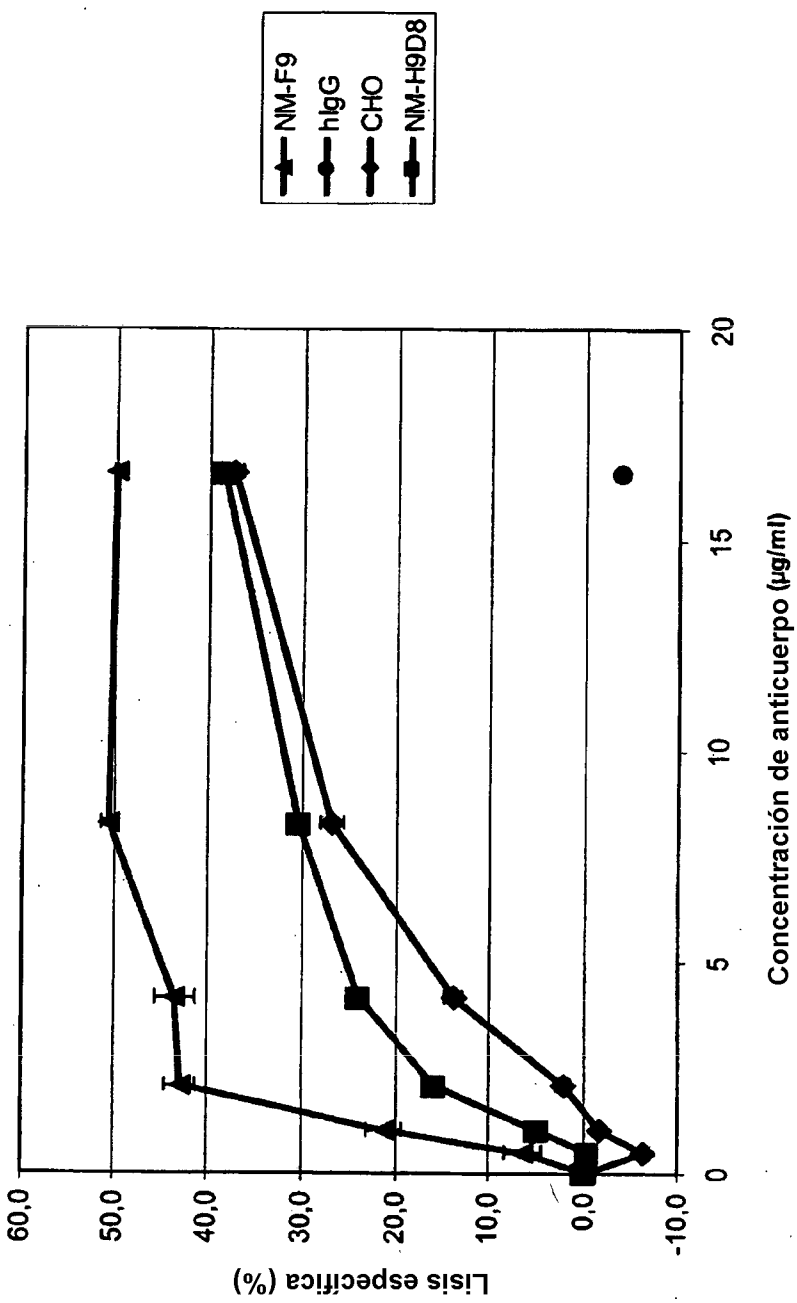

NM-F9
hIgG
CHO
NM-H9D8
Lisis específica (%)
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
0
5
10
15
20
Concentración de anticuerpo (µg/ml)

Fig. 8

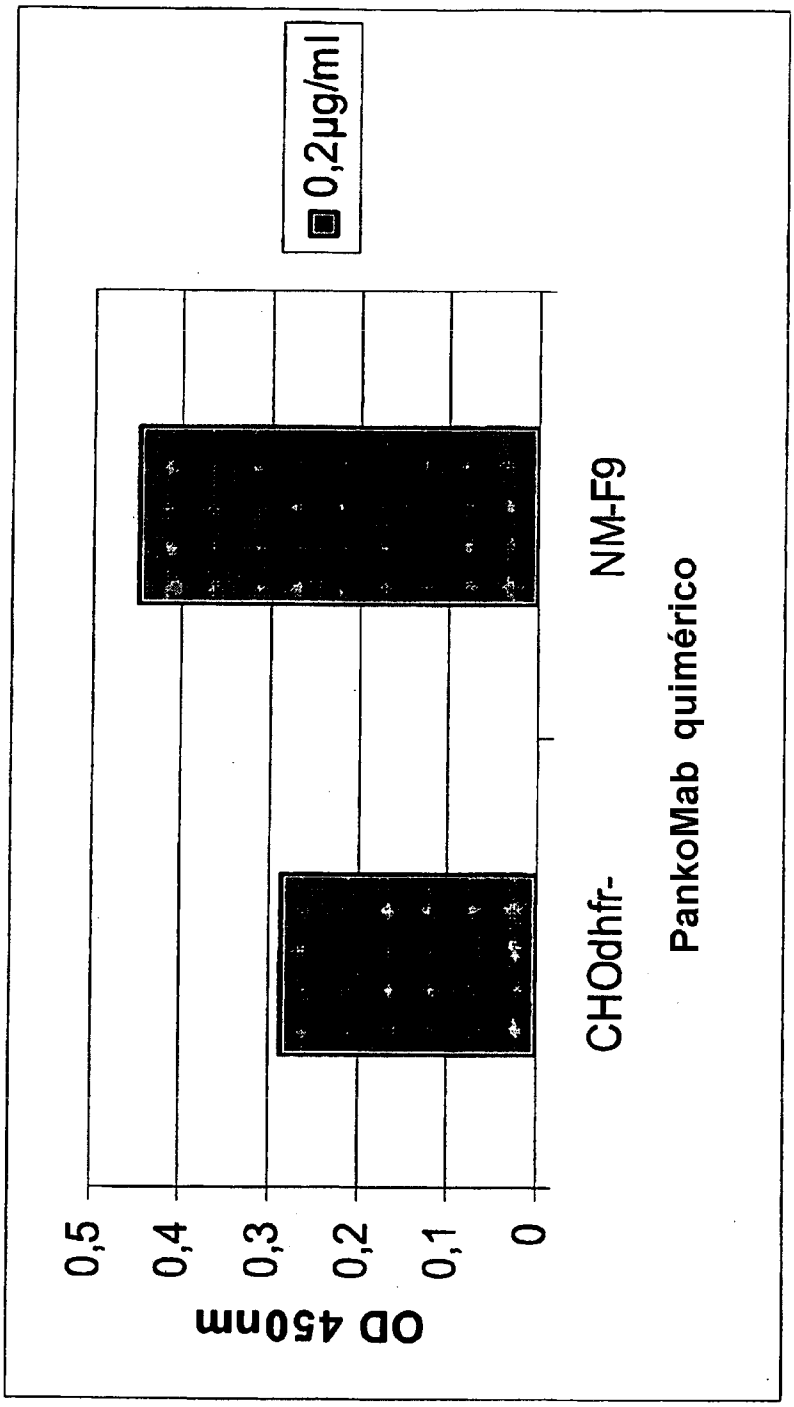

0,2µg/ml
OD 450nm
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
CHOdhfr-
NM-F9
PankoMab quimérico

Fig. 9

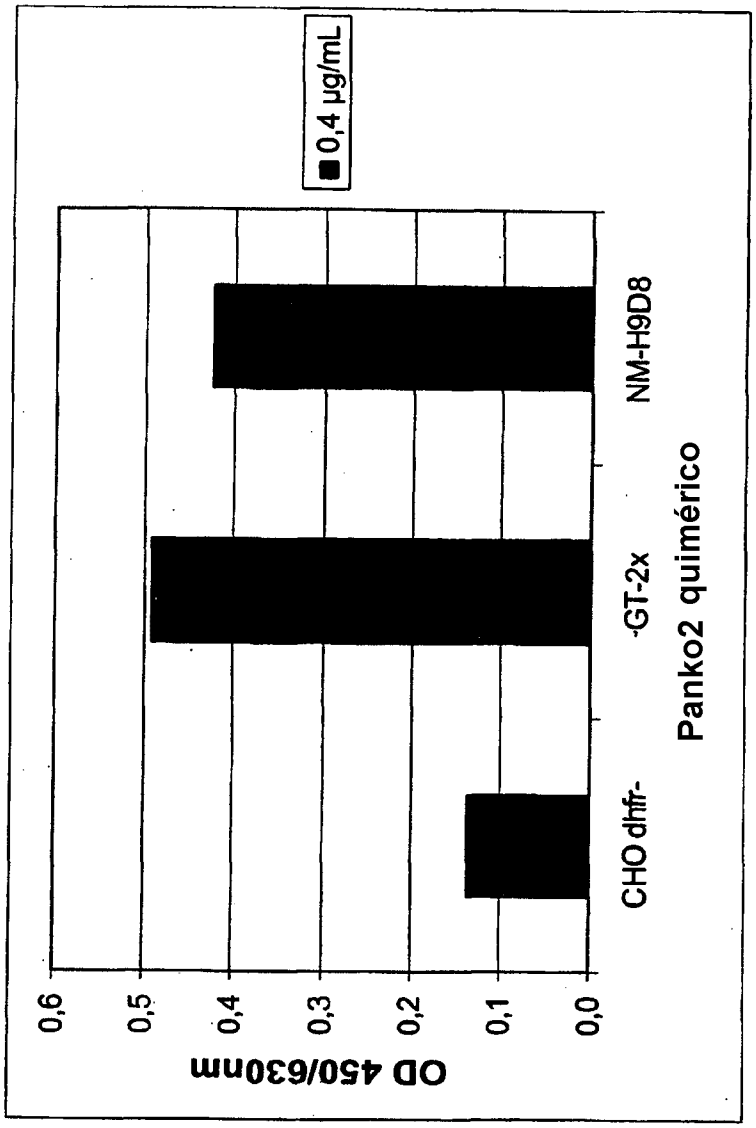

0,4 µg/mL
OD 450/630nm
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
CHO dhfr-
-GT-2x
NM-H9D8
Panko2 quimérico

Fig. 10

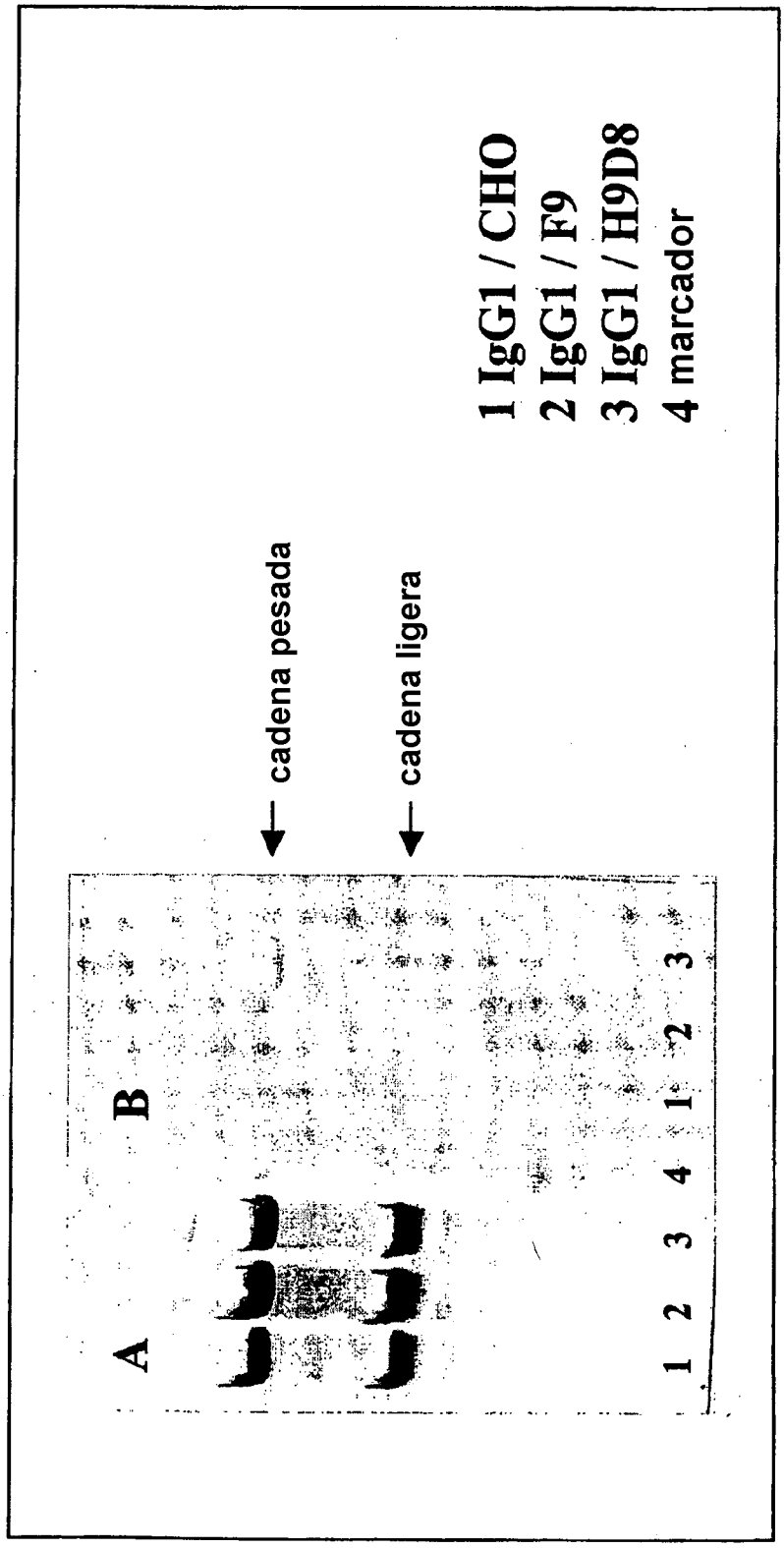

1 IgG1 / CHO
2 IgG1 / F9
3 IgG1 / H9D8
4 marcador
cadena pesada
cadena ligera
A
B
1 2 3 4 1 2 3

Fig. 11

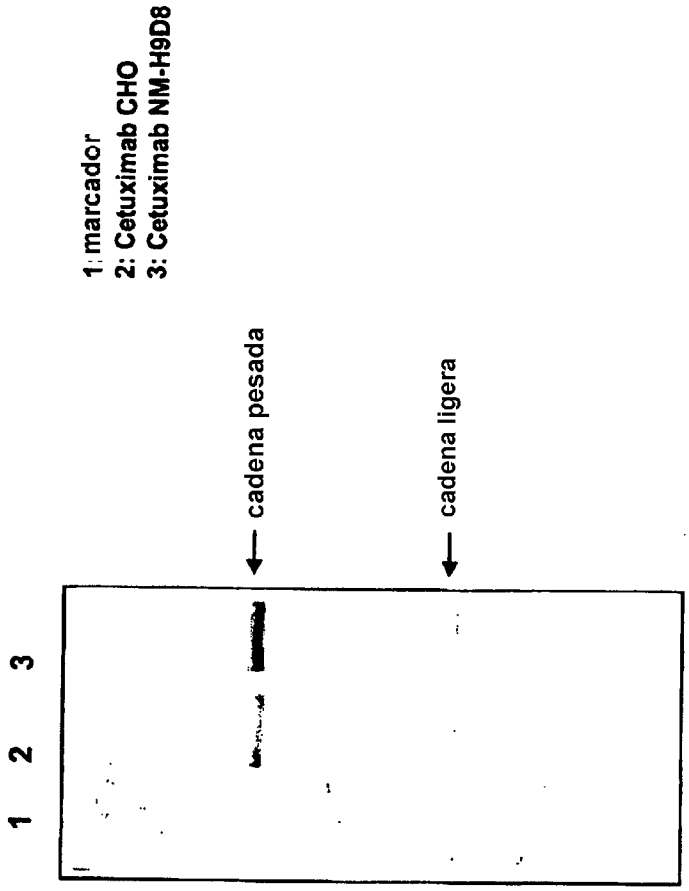

1: marcador
2: Cetuximab CHO
3: Cetuximab NM-H9D8
cadena pesada
cadena ligera
1 2 3

Fig. 12

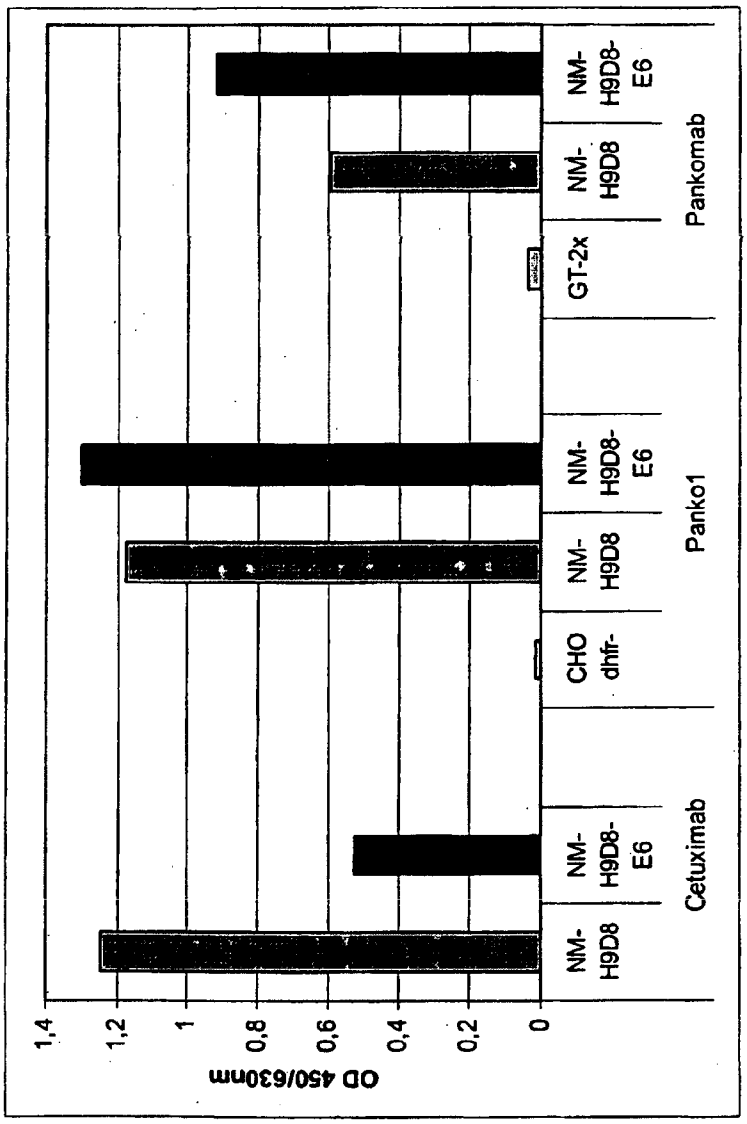

OD 450/630nm
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
NM-H9D8
NM-H9D8-E6
CHO dhfr-
NM-H9D8
NM-H9D8-E6
GT-2x
NM-H9D8
NM-H9D8-E6
Cetuximab
Panko1
Pankomab

Fig. 13a

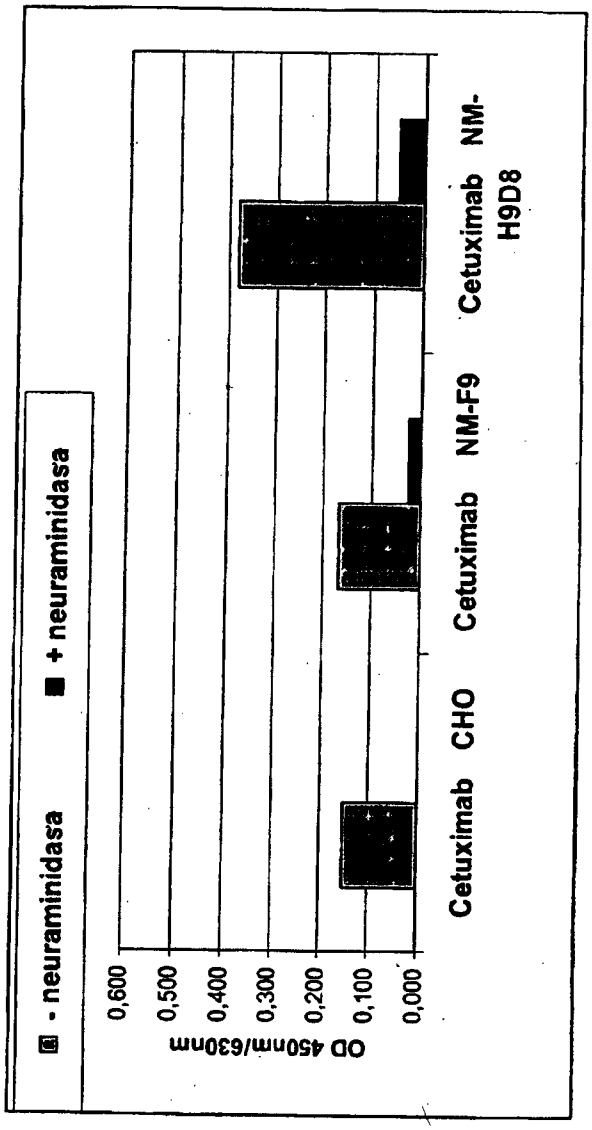

- neuraminidasa
+ neuraminidasa
OD 450nm/630nm
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0,000
Cetuximab CHO
Cetuximab NM-F9
Cetuximab NM-H9D8

Fig. 13b

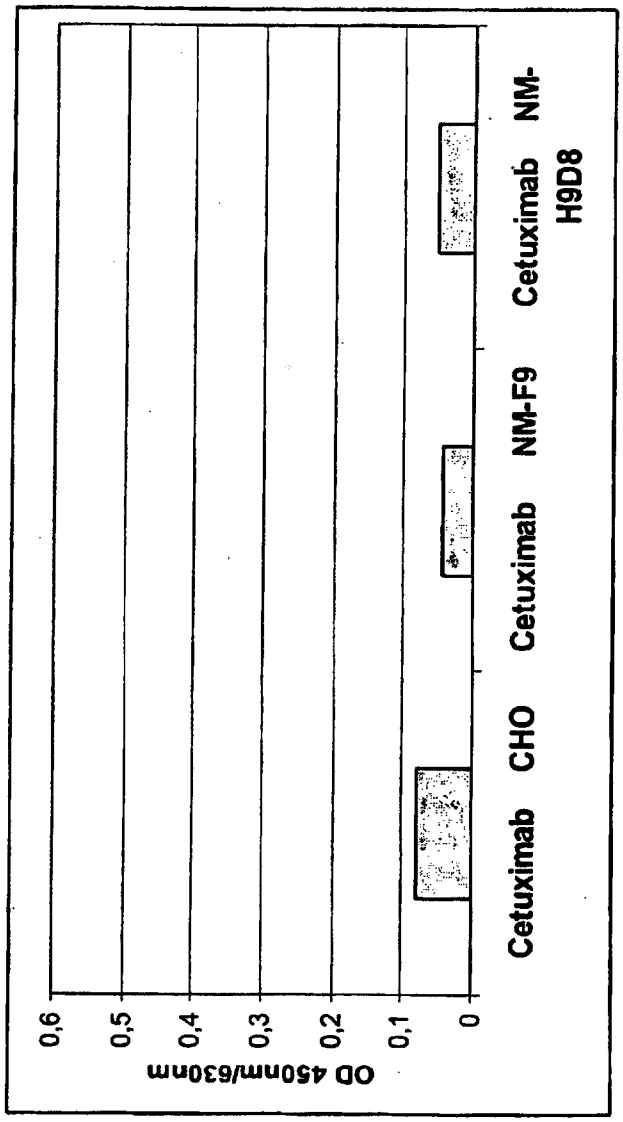

OD 450nm/630nm
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Cetuximab CHO
Cetuximab NM-F9
Cetuximab NM-H9D8

Fig. 14

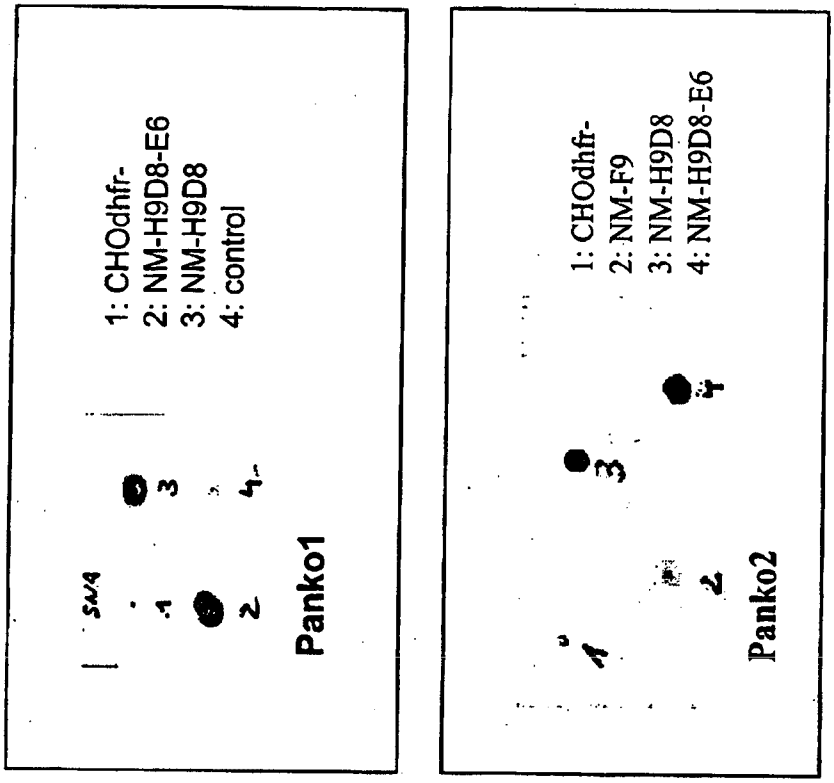
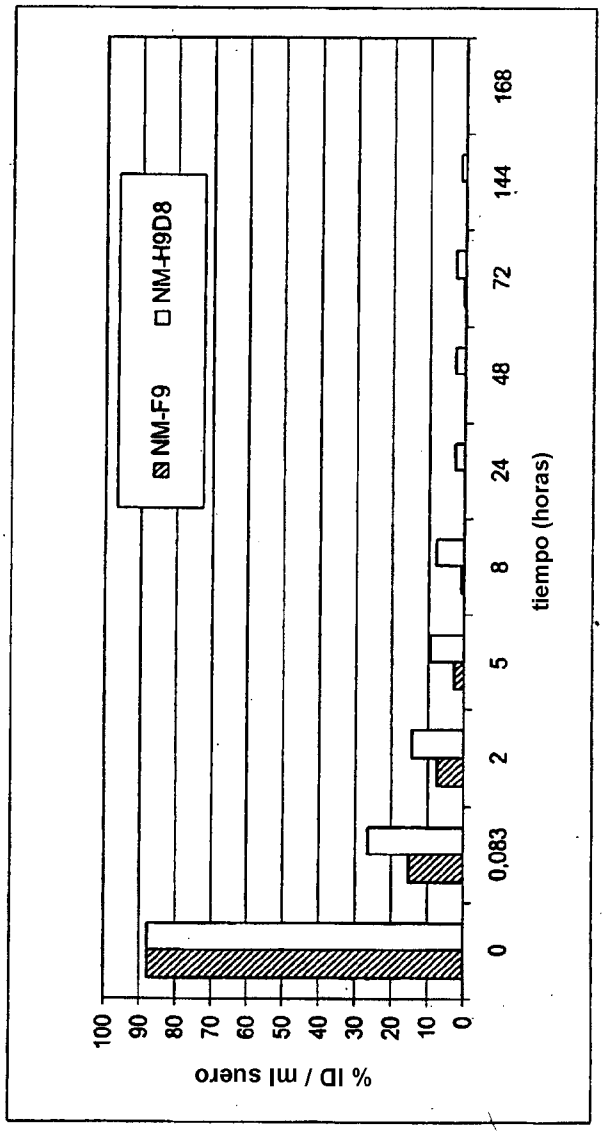

1: CHOdhfr-
2: NM-H9D8-E6
3: NM-H9D8
4: control
Panko1
1: CHOdhfr-
2: NM-F9
3: NM-H9D8
4: NM-H9D8-E6
Panko2

Fig. 15


% ID / ml suero
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,083
2
5
8
24
48
72
144
168
tiempo (horas)
NM-F9
NM-H9D8

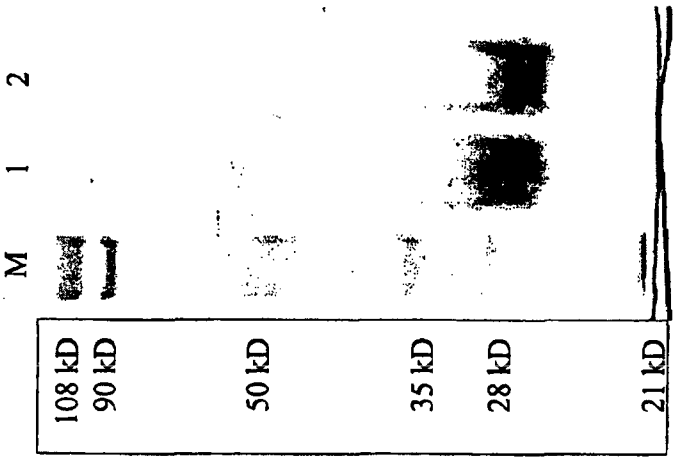


Fig. 16

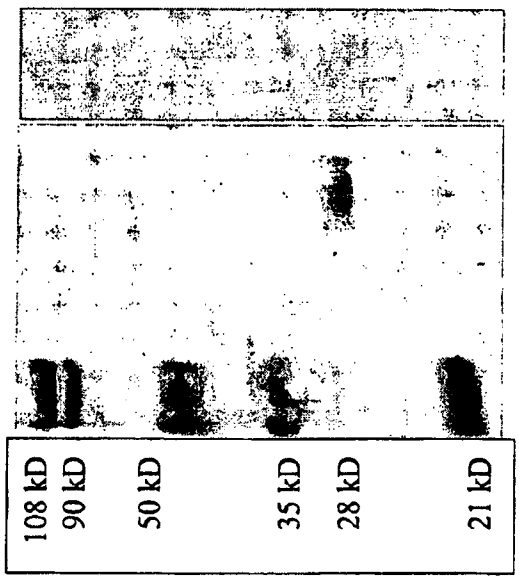
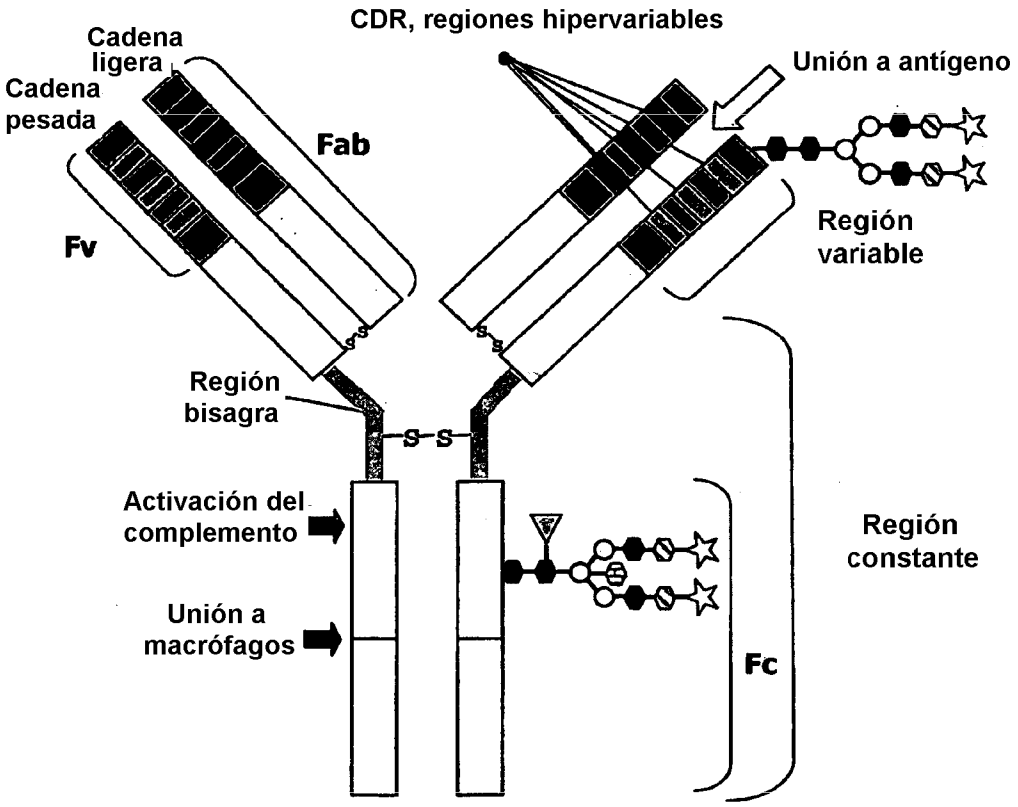


Fig. 17

Fig. 18



	= ácido siálico
	= Galactosa
	= GlcNAc
	= Manosa
	= Fucosa
	= GlcNAcbisectora