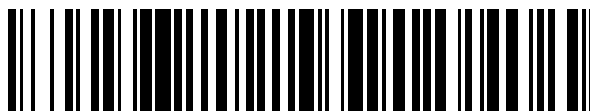


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 971**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2011** **PCT/JP2011/054549**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011** **WO11108502**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011** **E 11750612 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016** **EP 2543727**

54 Título: **Composición de anticuerpo modificado**

30 Prioridad:

02.03.2010 US 309631 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.02.2017

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP

72 Inventor/es:

NIWA RINPEI y
TSUCHIYA MAMI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 602 971 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de anticuerpo modificado.

5 Campo de la invención

La presente exposición se refiere a una composición de variante de anticuerpo en la que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas a la región Fc de un anticuerpo, las cadenas de azúcar que se encuentran unidas a residuos de Asn en una posición diferente de la posición 297 según el índice EU se encuentran reducidas o eliminadas; una composición de variante de anticuerpo en la que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas a la región Fc de un anticuerpo, las cadenas de azúcar adicionales que se encuentran unidas a los residuos de Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU se encuentran reducidas o eliminadas y la actividad efectora del anticuerpo se mantiene; un ADN codificante de las moléculas variantes de anticuerpo; una célula capaz de producir la composición de variante de anticuerpo, un procedimiento para producir la composición de variante de anticuerpo, y un método para reducir las cadenas de azúcar adicionales que se encuentran unidas a residuos de Asn en una posición diferente de la posición 297 según el índice EU entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas a la región Fc del anticuerpo.

20 Antecedentes de la técnica

Debido a que los anticuerpos presentan elevadas actividad de unión y especificidad de unión y elevada estabilidad en la sangre, se han intentado aplicaciones como agentes diagnósticos, preventivos y terapéuticos de diversas enfermedades humanas (documento no de patente nº 1). Además, se han preparado anticuerpos híbridos humanos o anticuerpos humanizados a partir de anticuerpos animales no humanos utilizando técnicas de recombinación (documentos no de patente nº 2 a nº 5).

Un anticuerpo híbrido humano comprende una región variable de anticuerpo de un anticuerpo animal no humano y una región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que las regiones determinantes de complementariedad (en adelante denominadas RDC) de un anticuerpo animal no humano han sido sustituidas por RDC de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos híbridos humanos y los anticuerpos humanizados han resuelto algunos problemas planteados por los anticuerpos animales no humanos, tales como los anticuerpos de ratón, tal como la elevada inmunogenicidad, la baja función efectora y la corta semivida en sangre, y han resultado posibles aplicaciones de los anticuerpos monoclonales en preparaciones farmacéuticas mediante la utilización de los mismos (documentos no de patente nº 6 a nº 9). En los Estados Unidos, por ejemplo, se ha autorizado una pluralidad de anticuerpos humanizados como anticuerpos para el tratamiento del cáncer y se encuentran disponibles comercialmente (documento no de patente nº 10).

Dichos anticuerpos híbridos humanos y anticuerpos humanizados de hecho muestran efectos en cierto grado al nivel clínico, pero se requieren anticuerpos terapéuticos con efectos más elevados.

Por ejemplo, en el caso de la administración única de Rituxan (marca comercial registrada) (documento no de patente nº 1) (fabricado por IDEC/Roche/Genentech), que es un anticuerpo híbrido humano de CD20, se ha informado que su tasa de respuesta para los pacientes de linfoma no Hodgkin de bajo grado de malignidad recurrente en el ensayo clínico de fase III no es superior a 48% (remisión completa: 6%; remisión parcial: 42%) y la duración media de la respuesta es de 12 meses (documento no de patente nº 12).

En el caso de la utilización combinada de Rituxan (marca comercial registrada) y quimioterapia (CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina), se ha informado de que su proporción de respuesta para los pacientes de linfoma no Hodgkin de bajo grado de malignidad y folicular recurrente en el ensayo clínico de fase II es de 95% (remisión completa: 55%; remisión parcial: 45%) aunque se han observado efectos secundarios de CHOP (documento no de patente nº 13).

En el caso de la administración única de Herceptin (marca comercial registrada) (fabricado por Genentech), que es un anticuerpo humanizado de HER2, se ha informado de que su tasa de respuesta para los pacientes de cáncer de mama metastásico en el ensayo clínico de fase III es de sólo 15% y la duración media de la respuesta es de 9,1 meses (documento no de patente nº 14).

La molécula de anticuerpo humano también se denomina inmunoglobulina (en adelante denominada Ig) y se clasifica en los isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM basándose en su estructura molecular.

Una molécula de anticuerpo de tipo IgG humana (en adelante denominada IgG) que se utiliza principalmente como anticuerpo terapéutico es una molécula de anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas (en adelante denominada cadena H) y dos cadenas ligeras (en adelante denominada cadena L).

Una cadena H comprende estructuras de dominio individuales que se denominan, respectivamente, una región variable de cadena H (en adelante denominada VH), y los dominios CH1, de bisagra, CH2 y CH3 desde el extremo N-terminal. Además, el dominio CH2 y el dominio CH3 en combinación se denominan región Fc.

Una cadena L comprende estructuras de dominio individuales que se denominan, respectivamente, región variable de cadena L (en adelante denominada VL) y una región constante de cadena L (en adelante denominada CL) desde el extremo N-terminal.

La cadena H del anticuerpo de tipo IgG incluye cuatro subclases que consisten de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cadenas H de las subclase de IgG individuales son homólogas entre sí con una identidad de secuencia de aminoácidos de prácticamente 95% en la región constante, excepto por las bisagras, altamente variables.

Aunque las subclases de IgG individuales son altamente homólogas entre sí respecto a la secuencia de aminoácidos, presentan una diferente intensidad de su actividad biológica (documento no de patente nº 15). Entre los ejemplos de actividades biológicas se incluyen una función efectora, tal como una citotoxicidad dependiente del complemento (en adelante denominada actividad CDC), una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante denominada actividad ADCC) y una actividad fagocítica. Estas actividades desempeñan un papel importante en la eliminación de sustancias foráneas y patógenos en el cuerpo vivo.

Una familia de receptores de Fc γ (en adelante denominados Fc γ R) se expresa sobre la superficie de diversos leucocitos, tal como células asesinas naturales (en adelante denominadas células NK), monocitos, macrófagos, granulocitos y similares.

Se clasifica Fc γ R en Fc γ R de tipo activo tales como Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb y Fc γ R de tipo inhibidor, tal como Fc γ RIIb. Los anticuerpos IgG, en particular IgG1 e IgG3 en el ser humano, se unen fuertemente a dichos receptores de manera que inducen actividad ADCC y fagocitosis por los leucocitos.

La actividad ADCC se refiere a una reacción de lisis celular que es generada por las moléculas citotóxicas liberadas por la célula NK, tal como perforina y granzima, como resultado de que un anticuerpo unido a un antígeno se une principalmente a Fc γ RIIIa sobre la superficie de las células NK a través de la fracción Fc (documentos no de patente nº 16 y nº 17). En general, la actividad ADCC muestra el orden IgG1>IgG3>IgG4 $\geq$ IgG2 (documentos no de patente nº 18 y nº 19). En el dominio CH2 de Fc del anticuerpo se encuentra presente un sitio de unión a Fc γ RIIIa y un análisis de la estructura cristalina muestra que una molécula de Fc γ RIIIa se une al espacio entre dos dominios CH2 (documento no de patente nº 20).

La actividad CDC se refiere a una reacción en la que un anticuerpo unido a su antígeno activa una cascada de reacción de un grupo de proteínas séricas denominado sistema del complemento y finalmente lisa la célula diana. La actividad de CDC es elevada en las IgG1 e IgG3 humanas y generalmente muestra un orden de IgG3 $\geq$ IgG1>IgG2 $\approx$ IgG4. El sistema del complemento se clasifica en los componentes respectivos de C1 a C9, y la mayoría de ellos son precursores enzimáticos que expresan la actividad enzimática mediante degradación parcial.

La actividad CDC induce la reacción de lisis celular a partir de la unión de C1q como un componente de C1 a la región Fc de un anticuerpo sobre la célula diana, a la que sigue la cascada de activación mediante la degradación parcial del componente respectivo por parte de los componentes de la etapa anterior, y formando finalmente una unidad formadora de poro que se denomina complejo de ataque membranal formado por C5 a C9 sobre la membrana celular de la célula diana (documentos no de patente nº 16 y nº 17). Un estudio de sustitución de aminoácido en la región Fc sugiere que el sitio de unión de C1q sobre la región Fc se encuentra presente en el dominio CH2 (documento no de patente nº 21).

La importancia de la función efectora anteriormente indicada se reconoce también en el mecanismo de efecto farmacológico del anticuerpo terapéutico destinado a la utilización en la práctica clínica. El Rituxan (marca comercial registrada) anteriormente indicado es un anticuerpo híbrido humano de subclase IgG1 que muestra actividad ADCC y actividad CDC in vitro (documento no de patente nº 22).

Además, con respecto a su efecto clínico, el Rituxan (marca comercial registrada) se sugiere que realmente muestra la función efectora en el cuerpo humano, ya que el Rituxan (marca comercial registrada) muestra un efecto terapéutico elevado en los pacientes con el genotipo Fc γ RIIIa que muestran una fuerte actividad ADCC (documento no de patente nº 23), los componentes del complemento en la sangre resultan rápidamente consumidos tras la administración (documento no de patente nº 24), la expresión de CD59 que es un factor que inhibe la actividad CDC está incrementada en las células de cáncer de los pacientes con recurrencia tras la administración (documento no de patente nº 25) y similares.

El Herceptin (marca comercial registrada) también es un anticuerpo humanizado de subclase IgG1 y se ha informado de que muestra efectos terapéuticos elevados en los pacientes con genotipo Fc γ RIIIa que muestra fuerte actividad ADCC (documento no de patente nº 26).

Además, debido a que la IgG humana escapa de la degradación por los lisosomas mediante la unión a un receptor de Fc neonatal (receptor de Fc neonatal para IgG; FcRn, en adelante denominado FcRn) que se expresa en células tales como las células endoteliales vasculares, bajo condiciones de pH bajo en el endosoma; presenta una semivida en sangre prolongada, de entre 7 días (IgG3) y 21 días (IgG1, IgG2 e IgG4). Basándose en el estudio de la sustitución de un residuo de aminoácido de Fc, se sugiere que el sitio de unión del Fc de anticuerpo y de FcRn se encuentra presente en la interfaz del dominio CH2 y el dominio CH3 (documento no de patente nº 27).

Basándose en lo anteriormente indicado, el anticuerpo IgG1 humano resulta más adecuado como anticuerpo terapéutico, ya que presenta actividades ADCC y CDC más elevadas y además presenta una semivida más larga en la sangre humana que otras subclases.

Es conocido que C1q se une a la región Fc de la molécula de anticuerpo. Las constantes de unión (K_a) en la unión de C1q a una molécula de anticuerpo monomérico en las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas son $1,2 \times 10^4$, $0,64 \times 10^4$, $2,9 \times 10^4$ y $0,44 \times 10^4$ M⁻¹, respectivamente (documento no de patente nº 28). Tal como se ha comentado anteriormente, resulta especialmente importante el dominio CH2 en la región Fc (documento no de patente nº 29).

Con mayor detalle, con respecto al índice EU (documento no de patente nº 30), es conocido que Leu 235 (documento no de patente nº 31), Asp 270, Lys 322, Pro 329 y Pro 331 (documento no de patente nº 32) en CH2 resultan importantes en la IgG1 humana, y Glu 233, Leu 234, Leu 235, Gly 236 (documento no de patente nº 33) y Lys 322 (documento no de patente nº 34) resultan importantes para la IgG3 humana.

Se han realizado intentos para incrementar la actividad CDC mediante la preparación de una variante de IgG en la que se han introducido sustituciones de aminoácidos en la región constante de cadena pesada de la IgG humana, incrementando de esta manera la actividad de unión a C1q de la misma.

Idusogie et al. han informado de que la actividad de CDC se incrementa en aproximadamente 2 veces como máximo en el caso de que la Lys en la posición 326 o la Glu en la posición 333 según el índice EU en el dominio CH2 de la región constante de cadena pesada de un anticuerpo híbrido anti-CD20, Rituxan (marca comercial registrada) que comprende una región constante de tipo IgG1 humana y una región variable derivada del ratón se sustituya por otro aminoácido (documento no de patente nº 35, documento de patente nº 2).

Idusogie et al. han demostrado además que la actividad CDC de IgG2, que era aproximadamente de uno por varios cientos de la actividad CDC de IgG1 se incrementa hasta aproximadamente 1/25 de la actividad CDC de la IgG1 al sustituir Lys en la posición 326 o Glu en la posición 333 según el índice EU en el anticuerpo de tipo IgG2 humano por otro aminoácido. (documentos de patente nº 3 a nº 5).

Además, Dall'Acqua et al. han informado de que la aplicación de diversas sustituciones de aminoácidos en la región bisagra de un anticuerpo anti-EphA2 de tipo IgG1 humana, una pluralidad de variantes muestra una actividad de unión a C1q más alta y una actividad CDC más alta que las del anticuerpo antes de las sustituciones (documento no de patente nº 35).

También es conocido un ejemplo diferente de las técnicas de introducción de sustituciones de aminoácidos en el que se incrementa la actividad CDC mediante una combinación de secuencias existentes naturalmente. Shitara et al. han encontrado que al sustituir la totalidad del dominio CH2 de la IgG1 humana y la totalidad del dominio CH3 o una parte del lado N-terminal de la IgG1 humana por la secuencia de la IgG3 humana, se incrementan en gran medida la actividad de unión a C1q y la actividad CDC respecto a las de la IgG1 y la IgG3 (documento de patente nº 6, documento no de patente nº 36).

Existen dos tipos de cadenas de azúcar que se unen a una proteína: la cadena de azúcar unida a N-glucósido y la cadena de azúcar unida a O-glucósido. La cadena de azúcar que se une al átomo de N del grupo amida en la cadena lateral de Asn en la proteína es una cadena de azúcar unida a N-glucósido y la cadena de azúcar que se encuentra unida al átomo de O de un grupo hidroxilo en la cadena lateral de Ser y Thr en la proteína es una cadena de azúcar unida a O-glucósido.

La cadena de azúcar unida a N-glucósido incluye tres tipos, es decir, una cadena de azúcar de tipo manosa, una cadena de azúcar de tipo complejo y una cadena de azúcar de tipo híbrido.

El proceso de biosíntesis de la cadena de azúcar unida a N-glucósido se inicia en el retículo endoplasmático rugoso mediante la unión de dolicol-ácido pirofosfórico-oligosacárido que contiene 9 moléculas de manosa (Man) [(Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂] al residuo Asn de una secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr (X es cualquier aminoácido diferente de la prolina) de la cadena de azúcar unida a N-glucósido. A continuación, se convierte el intermediario cadena sacárido en tipos ricos en manosa, tal como el tipo Man8, el tipo Man7, el tipo Man6 y el tipo Man5 mediante diversos enzimas para sintetizar cadenas de azúcar de tipo complejo a las que se une N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico, fucosa y similares, en lugar de manosa (documento no de patente nº 37).

Sin embargo, es conocido que la cadena de azúcar unida a N-glucósido no se une a todas las secuencias de Asn-X-Ser/Thr en una proteína y no se une adicionalmente dependiendo de las secuencias de aminoácidos periféricas y la estructura tridimensional. En particular es conocido que la adición de una cadena de azúcar al residuo de Asn de Asn-X-Ser/Thr prácticamente no se produce en el caso de que el aminoácido contiguo al lado C-terminal de Asn-X-Ser/Thr es Pro (documentos no de patente nº 38 y nº 39).

Es conocido que una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se une únicamente a Asn en la posición 297 del dominio CH2 en la región constante de la IgG humana (documento no de patente nº 40); sin embargo, no es conocido que la cadena de azúcar se una en otra posición. Es conocido únicamente que la cadena de azúcar unida a N-glucósido se une a Asn en la posición 471 de la región constante de la IgG3 de ratón (documento no de patente nº 41).

Por otra parte, se encuentra presente una secuencia de Asn-Thr-Thr en las posiciones 392 a 394 del dominio CH3 en la región constante de tipo IgG3 humana, pero el aminoácido en la posición 395 es Pro (documento no de patente nº 42) y de hecho no se conoce la adición de la cadena de azúcar a Asn en la posición 392 de la IgG3.

Es conocido que la actividad ADCC de la IgG humana se modifica dependiendo de la estructura de la cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo que debe unirse a la Asn en la posición 297 (se muestra en la figura 1 una ilustración esquemática típica de una cadena de azúcar de tipo complejo) (documento de patente nº 7).

Aunque existe informes que indican que la actividad ADCC de los anticuerpos cambia dependiendo de las cantidades contenidas de galactosa y N-acetilglucosamina en las cadenas de azúcar que se unirán a los anticuerpos (documentos no de patente nº 43 a nº 46), una sustancia que ejerce la mayor parte de la influencia sobre la actividad ADCC es la fucosa que participa en el enlace α 1,6 al extremo terminal reductor de la N-acetilglucosamina (en adelante denominado fucosa nuclear en algunos casos).

Un anticuerpo IgG que comprende una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo que no presenta fucosa nuclear muestra una actividad ADCC marcadamente más alta que la de un anticuerpo IgG que comprende una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo que presenta fucosa nuclear (documentos no de patente nº 47 y nº 48, documento de patente nº 7).

Se conocen como células que producen una composición de anticuerpos que comprende cadenas de azúcar unidas a glucósido de tipo complejo que no presentan fucosa nuclear, células en las que se ha inactivado el gen α 1,6-fucosiltransferasa (documentos de patente nº 8 y nº 9).

Todas las actividades dependientes de Fc γ R, tales como la actividad ADCC, la fagocitosis, la actividad CDC y la actividad de unión de FcRn resultan importantes para el efecto terapéutico de un anticuerpo terapéutico.

Sin embargo, debido a que toda la unión a C1q, que es la etapa inicial de inducción de la actividad CDC, la unión a Fc γ R, que es la etapa inicial de la inducción de la actividad ADCC, y la unión a FcRn, que contribuye a una semivida en sangre prolongada, se producen a través de la región Fc del anticuerpo, existe la posibilidad de que dichas actividades se reduzcan al introducirse una sustitución de aminoácido en la región Fc del anticuerpo.

Idusogie et al. han informado de que la actividad ADCC se reduce en gran medida en el caso de que se introduzca una mutación puntual de aminoácido en el dominio CH2 de la IgG1 con actividad CDC potenciada (documento no de patente nº 49).

Además, Dall'Acqua et al. informan del fenómeno de que la introducción de la mutación de aminoácido en el dominio CH2 de la IgG1 para incrementar la actividad de unión a FcRn simultáneamente reduce la actividad ADCC (documento no de patente nº 50).

Resulta interesante que estos informes muestran que aunque los sitios de unión a Fc γ RIIIa, C1q y FcRn en la región Fc se encuentran situados en posiciones ligeramente diferentes, la sustitución de aminoácido para modificar cada actividad de unión presenta influencias inesperadas sobre otros sitios de unión.

El aminoácido en la posición 392 de la región constante de cadena pesada de IgG se sitúa en la interfaz de los dos dominios CH3 en la molécula de anticuerpo (documento no de patente nº 51). Debido a que el aminoácido situado en la interfaz desempeña un papel importante en la asociación de dos moléculas de cadena pesada (documento no de patente nº 52), por ejemplo, al modificar el aminoácido en la posición 392, existe la posibilidad de que presente influencias inesperadas sobre la estructura tridimensional y diversas actividades biológicas de la molécula de anticuerpo.

Listado de referencias

Documentos de patente

- 5 Documento de patente nº 1: EP0327378
Documento de patente nº 2: US2003/0158389
Documento de patente nº 3: WO00/42072
Documento de patente nº 4: US2004/0132101
Documento de patente nº 5: US2005/0054832
- 10 Documento de patente nº 6: WO2007/011041
Documento de patente nº 7: WO00/61739
Documento de patente nº 8: WO02/31140
Documento de patente nº 9: WO03/85107
- 15 Documento no de patente nº
Documento no de patente nº 1: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995)
Documento no de patente nº 2: Nature, 312, 643 (1984)
Documento no de patente nº 3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 (1984)
- 20 Documento no de patente nº 4: Nature , 321, 522 (1986)
Documento no de patente nº 5: Nature, 332, 323 (1988)
Documento no de patente nº 6: Immunol. Today, 21, 364 (2000)
Documento no de patente nº 7: Immunol. Today, 21, 403 (2000)
Documento no de patente nº 8: Ann. Allergy Asthma Immunol., 81, 105 (1998)
- 25 Documento no de patente nº 9: Nature Biotechnol., 16, 1015 (1998)
Documento no de patente nº 10: Nature Reviews Cancer, 1, 119 (2001)
Documento no de patente nº 11: Curr. Opin. Oncol., 10, 548 (1998)
Documento no de patente nº 12: J. Clin. Oncol., 16, 2825 (1998)
Documento no de patente nº 13: J. Clin. Oncol., 17, 268 (1999)
- 30 Documento no de patente nº 14: J. Clin. Oncol., 17, 2639 (1999)
Documento no de patente nº 15: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995)
Documento no de patente nº 16: Chemical Immunology, 65, 88 (1997)
Documento no de patente nº 17: Immunol. Today, 20, 576 (1999)
Documento no de patente nº 18: Nature, 332, 323 (1988)
- 35 Documento no de patente nº 19: Journal of Experimental Medicine, 166, 1351 (1987)
Documento no de patente nº 20: Nature, 406, 267 (2000)
Documento no de patente nº 21: J. Immunol., 166, 2571 (2001)
Documento no de patente nº 22: Oncogene, 22, 7359 (2003)
Documento no de patente nº 23: Blood, 99, 754 (2002)
- 40 Documento no de patente nº 24: J. Immunol., 172, 3280 (2004)
Documento no de patente nº 25: J. Clin. Oncol., 21, 1466 (2003)
Documento no de patente nº 26: J. Clin. Oncol., 26, 1789 (2008)
Documento no de patente nº 27: Nature Reviews Immunology, 7, 715 (2007)
Documento no de patente nº 28: Biochemistry, 15, 5175 (1976)
- 45 Documento no de patente nº 29: Journal of Experimental Medicine, 173, 1025 (1991)
Documento no de patente nº 30: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63, 78 (1969)
Documento no de patente nº 31: Immunology, 86, 319 (1995)
Documento no de patente nº 32: J. Immunol., 164, 4178 (2000)
Documento no de patente nº 33: Mol. Immunol., 34, 1019 (1997)
- 50 Documento no de patente nº 34: Mol. Immunol., 37, 995 (2000)
Documento no de patente nº 35: The Journal of Immunology, 177, 1129 (2006)
Documento no de patente nº 36: Cancer Research, 68, 3863 (2008)
Documento no de patente nº 37: Molecular Cell Biology, Third Edition, W. H. Freeman and company, New York, New York and Oxford (1995)
- 55 Documento no de patente nº 38: Protein Engineering, 3, 433 (1990)
Documento no de patente nº 39: Biochemistry, 37, 6833 (1998)
Documento no de patente nº 40: Immunology, Fifth Edition, Mosby International Ltd (1998)
Documento no de patente nº 41: Mol. Immunol, 34, 593 (1997)
Documento no de patente nº 42: Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Dept. Health and
- 60 Human Services (1991)
Documento no de patente nº 43: Human Antib Hybrid, 5, 143 (1994)
Documento no de patente nº 44: Hum Antib Hybrid, 6, 82 (1995)
Documento no de patente nº 45: Nat. Biotechnol., 17, 176 (1999)
Documento no de patente nº 46: Biotechnol. Bioeng., 74, 288 (2001)
- 65 Documento no de patente nº 47: J Biol. Chem., 277, 26733 (2002)
Documento no de patente nº 48: J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)

Documento no de patente nº 49: The Journal of Immunology, 166, 2571 (2001)
 Documento no de patente nº 50: J. Biol. Chem., 281, 23514, (2006)
 Documento no de patente nº 51: Protein Engineering, 9, 617 (1996)
 Documento no de patente nº 52: Immunology, 105, 9 (2002)

5

Sumario de la invención

Problemas que debe resolver la invención

10 Entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, la cadena de azúcar que se une a la Asn en la posición 297 se refiere a la actividad y estabilidad en sangre del anticuerpo, aunque hay una posibilidad de que las cadenas de azúcar adicionales unidas a los residuos de aminoácidos en posiciones diferentes de la posición 297 presenten influencias sobre la actividad mediada por la región constante de anticuerpo y una posibilidad de provocar un problema de uniformidad como preparación de anticuerpos terapéutica. De acuerdo
 15 con lo anteriormente expuesto, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, se requiere un método para controlar las cadenas de azúcar adicionales que se unen al residuo Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU.

20 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición de variante de anticuerpo en la que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, se encuentran reducidas o eliminadas las cadenas de azúcar que se unen a los residuos de Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU.

Medios para resolver los problemas

25 Basándose en los problemas anteriormente indicados, los inventores llevaron a cabo investigaciones y encontraron que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, las cadenas de azúcar que se unen a los residuos de Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU se reducen o se eliminan llevando a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de
 30 aminoácido de Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido de X por Pro y una sustitución de aminoácido de Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos de una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc de un anticuerpo IgG humano y de esta manera se llevó a cabo la presente invención.

35

Por lo tanto, el sumario de la invención es el siguiente.

[1] Una composición de variante de anticuerpo y una composición de fragmento de variante de anticuerpo, que comprende los residuos de aminoácidos de una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X representa un residuo de aminoácido diferente de Pro) en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que en la secuencia Asn-X-Ser/Thr, se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido de Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido de X por Pro y una sustitución de aminoácido de Ser/Thr por otro residuo de aminoácido, en el que la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) son los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU, y en el que la región Fc de un anticuerpo IgG humano comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1.

40

45

50

[2] La composición de variante de anticuerpo o la composición de variante de anticuerpo según [1], en la que por lo menos un residuo de aminoácido de entre los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:

posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp,
 posición 393 según el índice EU: Pro,
 posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

55

[3] La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo según cualquiera de [1] a [2], que comprende un dominio CH1 y un dominio bisagra, en el que el dominio CH1 y el dominio bisagra comprende una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humano.

60

[4] La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo según cualquiera de [1] a [3], que comprende una región Fc en la que Thr en la posición 339 según el índice EU se sustituye por un residuo de aminoácido Asn o Tyr, y/o Met en la posición 397 según el índice EU se sustituye por como mínimo un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe.

65

[5] Un ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo según cualquiera de [1] a [4].

[6] Un vector que comprende el ADN según [5].

[7] Un transformante obtenible mediante la introducción del vector según [6] en una célula anfitriona.

[8] Un procedimiento para producir la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo según cualquiera de [1] a [4], que comprende cultivar el transformante según [7] en un medio para formar y acumular la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo según cualquiera de [1] a [4] en el cultivo y purificar la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo, a partir del cultivo.

[9] Un método para reducir las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas en el residuo de Asn en una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que una cadena de azúcar unida a N-glucósido se encuentra unida a un residuo de Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano, comprendiendo el método llevar a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido X por Pro y una sustitución de aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos en la secuencia Asn-X-Ser/Thr.

[10] El método según [9], en el que por lo menos un residuo de aminoácido de los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:

posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp, posición 393 según el índice EU: Pro, posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

En la presente memoria se da a conocer además:

1. Una composición de variante de anticuerpo, que comprende residuos de aminoácidos de una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) diferente de en las posiciones 297 a 299 según el índice EU en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre un residuo de aminoácido Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido X por Pro y una sustitución de aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido, y una composición de fragmento de variante de anticuerpo.

2. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en el ítem 1, anteriormente, en el que la cadena de azúcar unida a N-glucósido se encuentra unida a Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano.

3. La composición de variante de anticuerpo y/o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en el ítem 1 o 2, anteriormente, en el que la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU son los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU.

4. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 3, anteriormente, en el que por lo menos un residuo de aminoácido de los residuos de aminoácidos 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:

posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp, posición 393 según el índice EU: Pro, posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

5. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 4, anteriormente, en la que la región Fc de un anticuerpo IgG humano comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1.

6. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 5, anteriormente, que comprende un dominio CH1 y un dominio de bisagra, en el que el dominio CH1 y el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humano.

7. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada

en cualquiera de los ítems 1 a 6, anteriormente, que comprende una región Fc en la que Thr en la posición 339 según el índice EU se sustituye por un residuo de aminoácido Asn o Tyr.

8. La composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 7, anteriormente, que comprende una región Fc de anticuerpo en la que Met en la posición 397 según el índice EU se sustituye por como mínimo un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe.

9. Un ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 8, anteriormente.

10. Un vector que comprende el ADN obtenible en el ítem 9, anteriormente.

11. Un transformante obtenido mediante la introducción del vector indicado en el ítem 10, anteriormente, en una célula anfitriona.

12. Un procedimiento para producir la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo en cualquiera de los ítems 1 a 8, anteriormente, que comprende cultivar el transformante indicado en el ítem 11, anteriormente, en un medio, para formar y acumular la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo indicada en cualquiera de los ítems 1 a 8, anteriormente, en el cultivo, y purificar la composición de variante de anticuerpo o la composición de fragmento de variante de anticuerpo a partir del cultivo.

13. Un método para reducir las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas a residuos de Asn en una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, que comprende llevar a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido de Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido X por Pro y una sustitución de aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos de la secuencia Asn-X-Ser/Thr.

14. El método descrito en el ítem 13, anteriormente, en el que una cadena de azúcar unida a N-glucósido se encuentra unida en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano.

15. El método descrito en el ítem 13 o 14, anteriormente, en el que la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones de índice EU 297 a 299 se encuentra en las posiciones 392 a 394 según el índice EU.

16. El método descrito en cualquiera de los ítems 13 a 15, anteriormente, en el que por lo menos un residuo de aminoácido de las posiciones 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:

posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp, posición 393 según el índice EU: Pro, posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

17. El método descrito en cualquiera de los ítems 13 a 16, anteriormente, en el que la región Fc del anticuerpo IgG humano comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1.

18. El método descrito en cualquiera de los ítems 13 a 17, anteriormente, en el que el anticuerpo IgG humano comprende un dominio CH1 y un dominio bisagra, y en el que el dominio CH1 y el dominio bisagra comprenden una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humano.

Efectos de la invención

La composición de variante de anticuerpo y la composición de fragmento de variante de anticuerpo según la presente exposición incluye una composición de variante de anticuerpo en la que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, se reducen o eliminan las cadenas de azúcar que se unen a los residuos Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU; una composición de variante de anticuerpo en la que, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de anticuerpo, se reducen o se eliminan cadenas de azúcar adicionales que se unen a los residuos Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU y se mantiene la actividad efectora del anticuerpo, y fragmentos de las composiciones de variante de anticuerpo.

En las composiciones de variante de anticuerpo y fragmentos de las composiciones de variante de anticuerpo de la presente exposición, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen a la región Fc de un anticuerpo, se reduce o se eliminan las cadenas de azúcar que se unen a los residuos de Asn en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU. De acuerdo con lo anterior, no presentan influencias sobre la actividad mediada por región constante de anticuerpo por las cadenas de azúcar adicionales unidas a los residuos de aminoácidos en posiciones diferentes de la posición 297 y no provocan un problema de uniformidad como preparación de anticuerpos terapéutica y, por lo tanto, resultan marcadamente útiles.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1(a) y (b) representan la estructura típica de la cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo (cadena sacárida de tipo complejo).

[Figura 2] La figura 2(a) a (c) representan estructuras del anticuerpo de tipo 113F con intercambio de dominios IgG1/IgG3 y que presenta una elevada actividad CDC.

[Figura 3] La figura 3 es una ilustración que muestra una imagen de SDS-PAGE de GM2-113F. El carril 1 son marcadores de peso molecular y el carril 2 es un resultado del análisis de GM2-113F. Los pesos moleculares de los marcadores de peso molecular se muestran en el lado izquierdo de la figura 3.

[Figura 4] La figura 4 muestra una comparación entre las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena H del anticuerpo IgG1, del anticuerpo IgG3 y del anticuerpo de tipo 113F. Los residuos de aminoácidos mostrados con un carácter en negrita son sitios en los que los aminoácidos son diferentes de los del anticuerpo IgG1 y del anticuerpo IgG3. El asterisco representa el residuo en el que se ha llevado a cabo una sustitución de aminoácido en el presente estudio.

[Figura 5] La figura 5 muestra un procedimiento de preparación de vector de expresión. En la figura 5, la línea de puntos en una parte de un vector representa que las secuencias de nucleótidos diferentes de la región constante de cadena H no resultan confirmadas tras la PCR.

[Figura 6] La figura 6(a) y (b) muestran los resultados de mediciones de la actividad CDC del transfectante de CD20 KC1156 a diversas concentraciones de anticuerpo 113F, N392K, T394Y, T394F y Rituximab. En el gráfico, la ordenada representa la citotoxicidad (%) y las abscisas representan la concentración de anticuerpo. El ensayo se llevó a cabo con N=3.

[Figura 7] La figura 7(a) a (e) muestran los resultados de las mediciones de la actividad CDC para las líneas celulares tumorales positivas para CD20 Raji, Daudi, ST486, EHEB y MEC-1 a diversas concentraciones de anticuerpo 113F, N392K, T394K, T394F, N392K/T339Y y Rituximab. En el gráfico, la ordenada representa la citotoxicidad (%) y las abscisas representan la concentración de anticuerpo. El ensayo se llevó a cabo con N=3.

[Figura 8] La figura 8 muestra un resultado de la medición de la actividad de unión a C1q del anticuerpo 113F, N392K, T394Y y T394F utilizando un citómetro de flujo. En el ensayo se utilizó una célula tumoral Daudi positiva para CD20 y tras dejar reaccionar cada anticuerpo con suero humano, se detectó la unión de C1q con anticuerpo anti-C1q humano marcado con FITC. En el gráfico, la ordenada representa la intensidad media de fluorescencia (IMF) y las abscisas representan la concentración de anticuerpo. El ensayo se llevó a cabo con N=3.

Formas de realización para poner en práctica la invención

La composición de variante de anticuerpo y el fragmento de la composición de variante de anticuerpo de la presente exposición son las composiciones de variante de anticuerpo en las que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido X por Pro y una sustitución de aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido, en los residuos de aminoácidos de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU de Kabat et al. en la región Fc de un anticuerpo IgG humano, y un fragmento de la composición de variante de anticuerpo.

Según la invención, el índice EU representa Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, 1991. Todas las posiciones de los residuos de aminoácidos mostrados posteriormente se han numerado basándose en el índice EU, a menos que se indique lo contrario.

La secuencia Asn-X-Ser/Thr se refiere a una secuencia común en la que una cadena de azúcar tiende a unirse al grupo NH₂ del residuo Asn (en adelante denominada secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido, o simplemente secuencia de consenso).

En la invención, la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc de un anticuerpo IgG humano es Asn en las posiciones 392 a 394.

Además, entre los ejemplos específicos de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen una composición de variante de anticuerpo en la que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido X por Pro y una sustitución de aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo.

Entre los ejemplos más específicos de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo en la que por lo menos un residuo de aminoácido de entre los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes, y similares:

posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp,
posición 393 según el índice EU: Pro,
posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

Entre los ejemplos de la región Fc del anticuerpo IgG humano de la presente exposición se incluyen la región Fc en la que por lo menos la secuencia de aminoácidos de las posiciones 392 a 394 según el índice EU en la región Fc presenta Asn-Thr-Thr, específicamente la región Fc en la que una secuencia de aminoácidos entre las posiciones 231 a 434 según el índice EU es una secuencia de IgG3 humana y una secuencia de aminoácidos entre las posiciones 435 y 447 según el índice EU es IgG1 humana, más específicamente la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1.

Entre los ejemplos específicos de la composición de variante de anticuerpo de la invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo en la que Asn en la posición 392 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr y Trp, la composición de variante de anticuerpo en la que Thr en la posición 339 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano se sustituye por Pro, la composición de variante de anticuerpo en la que Thr en la posición 394 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Trp y Tyr, y similares.

Entre los ejemplos más específicos de la composición de variante de anticuerpo de la invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo en la que Asn en la posición 392 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por Lys, una composición de variante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 y similares.

Además, entre los ejemplos de la composición de variante de anticuerpo de la invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo en la que Thr en la posición 339 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por Tyr además de las sustituciones de aminoácidos anteriormente indicadas, y la composición de variante de anticuerpo en la que Met en la posición 397 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe además de las sustituciones de aminoácidos anteriormente indicadas.

Además, entre los ejemplos de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 en la que Thr en la posición 339 según el índice EU se sustituye por Tyr y la composición de variante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 en la que Met en la posición 397 según el índice EU se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe.

Según la exposición, en los residuos de aminoácidos de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc de un anticuerpo IgG humano, el residuo de aminoácido que debe sustituirse por cualquier residuo de aminoácido de entre Asn, X y Ser/Thr puede seleccionarse tomando la posición en la que se lleva a cabo la sustitución de residuo de aminoácido y el residuo de aminoácido después de la sustitución considerada de manera que no se forme una nueva secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido como resultado de la sustitución de aminoácido.

Mediante la sustitución de los residuos de aminoácidos anteriormente indicados, la composición de variante de anticuerpo de la exposición resulta en la reducción o eliminación de las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se unen al residuo Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en

posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc de un anticuerpo IgG humano y presenta una actividad efectora igual o superior a la del anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de residuo de aminoácido.

5 Entre los ejemplos específicos de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen la composición de variante de anticuerpo que no presenta una cadena de azúcar unida a un residuo Asn en la posición 392 según el índice EU y que presenta una actividad efectora igual o superior a la del anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido.

10 En la presente invención, la expresión "las cadenas de azúcar que se unen a residuos de Asn se reducen o se eliminan" se refiere a que las cadenas de azúcar no se encuentran sustancialmente unidas en una composición de variante de anticuerpo tras llevar a cabo la sustitución de aminoácido en comparación con la composición de variante de anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido.

15 En la presente invención, la expresión "cadenas sacáridas no se encuentran unidas sustancialmente" se refiere a que el contenido de cadenas de azúcar que se unen al sitio modificado del residuo de aminoácido no se detecta o es inferior al límite de detección, al someterlo al análisis de las cadenas de azúcar indicado posteriormente.

20 La variante de anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier proteína con la condición de que sea una proteína que presenta una variante de Fc y que presenta una actividad de unión a una molécula diana según las reivindicaciones. Entre los ejemplos específicos se incluyen un anticuerpo monoclonal que presenta una variante de Fc, una proteína de fusión (en adelante también denominada inmuno adhesina) en la que un receptor o un ligando se fusiona con la región Fc, una proteína de fusión de Fc en la que se fusiona una pluralidad de regiones Fc con la región Fc de un anticuerpo, y similares.

25 El fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a una molécula diana incluye Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende RDC y similares.

30 La variante de anticuerpo de la presente invención se refiere a una proteína que presenta una variante de Fc según se reivindica.

En la presente invención, la variante de Fc se refiere a una región Fc en la que la sustitución de aminoácido se lleva a cabo de manera que se reducen o se eliminan las cadenas de azúcar que se unen a la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido en las posiciones índice EU 392 a 394 entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido unidas a la región Fc.

35 Es decir, la variante de Fc de la presente invención se refiere a una región Fc en la que se reducen o se eliminan las secuencias de consenso de cadena de azúcar unidas mediante enlace N-glucosídico de manera que una cadena de azúcar unida a N-glucosídico se une a Asn en la posición 297 según el índice EU en la región Fc y la otras cadenas de azúcar adicionales unidas mediante enlace N-glucósido no se unen a la región Fc.

40 Además, la región Fc de anticuerpo o meramente Fc en la presente exposición es cualquier secuencia de aminoácidos con la condición de que la secuencia de aminoácidos sea una secuencia de aminoácidos de Fc de una inmunoglobulina natural o alotipo de la misma informada en Kabat et al. [Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, 1991], o una secuencia de aminoácidos de Fc en la que la secuencia de aminoácidos se ha modificado con el fin de regular la actividad efectora, la estabilidad del anticuerpo, la extensión de la semivida en sangre y similares (documentos n° WO00/42072, n° WO2006/033386, n° WO2006/105338, n° WO2005/070963, n° WO2007/011041 y n° WO2008/145142). Además, la región Fc de anticuerpo puede ser cualquier región Fc con la condición de que una región Fc presente una actividad de unión a receptor de Fc y/o una región Fc presente una actividad efectora mediante la región Fc y el receptor de Fc.

45 Es decir, la composición de variante de anticuerpo de la presente exposición se refiere a una composición de variante de anticuerpo que comprende la variante de Fc en la que la unión adicional de las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido a una región Fc en una posición diferente del residuo de aminoácido en la posición 297 según el índice EU se reduce o se elimina y que presenta una actividad de unión controlada al receptor de Fc y/o una actividad efectora controlada.

50 En la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por una célula monoclonal productora de anticuerpos y reconoce únicamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y presenta una secuencia de aminoácidos uniforme (estructura primaria). La composición de variante de anticuerpo de la presente invención es una variante de anticuerpo que presenta sustancialmente una propiedad de un anticuerpo monoclonal e incluida en un anticuerpo monoclonal.

55 Entre los ejemplos del epítipo se incluyen una única secuencia de aminoácidos, una estructura tridimensional que comprende la secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos unida mediante una cadena de azúcar, una estructura tridimensional que comprende una secuencia de aminoácidos unida mediante una cadena de azúcar, y

similares, que es reconocida y se une a un anticuerpo monoclonal.

La molécula de anticuerpo también se denomina inmunoglobulina (en adelante denominada Ig) y el anticuerpo humano se clasifica en los isotipos IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM basándose en su estructura molecular. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que presentan una homología relativamente elevada en las secuencias de aminoácidos se denominan genéricamente IgG.

La molécula de anticuerpo comprende polipéptidos denominados cadena pesada (en adelante denominada cadena H) y cadena ligera (en adelante denominada cadena L).

Además, la cadena H comprende una región variable de cadena H (en adelante denominada VH) y una región constante de cadena H (en adelante denominada CH) y una cadena L comprende una región variable de cadena L (en adelante denominada VL) y la región constante de cadena L (en adelante denominada CL) a partir de su extremo N-terminal.

La CH es conocido que se clasifica en las subclases α , δ , ϵ , γ y μ . La CH está constituida adicionalmente por los dominios CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3.

El dominio se refiere a una unidad de constitución funcional que constituye cada polipéptido incluido en la molécula de anticuerpo. Además, el dominio CH2 y el dominio CH3 en combinación se denominan región Fc o meramente Fc. La CL se clasifica como cadena C λ y cadena C κ .

El dominio CH1, el dominio bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región Fc en la presente invención se definen por las posiciones de los residuos de aminoácidos a partir del extremo N-terminal según el índice EU.

Específicamente, CH1 se define como la secuencia de aminoácidos en las posiciones 118 a 215 según el índice EU, la bisagra se define como la secuencia de aminoácidos en las posiciones 216 a 230 según el índice EU, CH2 se define como la secuencia de aminoácidos en las posiciones 231 a 340 según el índice EU, y CH3 se define como la secuencia de aminoácidos en las posiciones 341 a 447 según el índice EU.

La variante de anticuerpo de la presente invención incluye especialmente un anticuerpo híbrido humano (en adelante simplemente denominado anticuerpo híbrido), un anticuerpo humanizado (también denominado anticuerpo injertado con región determinante de complementariedad (RDC)), un anticuerpo humano y similares.

El anticuerpo híbrido es un anticuerpo que comprende VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal diferente de un ser humano (animal no humano) y CH y CL de un anticuerpo humano. El animal no humano puede ser cualquier animal, tal como un ratón, una rata, un hámster o un conejo, con la condición de que pueda prepararse un hibridoma a partir del mismo.

Un hibridoma es una célula productora de un anticuerpo monoclonal que presenta la especificidad de antígeno deseado que se obtiene mediante fusión celular de una célula B obtenida mediante inmunización de un animal no humano con un antígeno, con una célula de mieloma derivada de un ratón o similar. De acuerdo con lo anterior, la región variable que constituye el anticuerpo producido por el hibridoma comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo animal no humano.

El anticuerpo híbrido humano puede producirse mediante la obtención de los ADNc codificantes de VH y VL a partir de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales derivado de un animal no humano, insertándolos en un vector de expresión para células animales que comprende ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano, construyendo de esta manera un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano e introduciendo después el vector en una célula animal para expresar el anticuerpo.

El anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que se injertan las secuencias de aminoácidos de RDC de VH y VL de un anticuerpo animal no humano en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano. La región diferente de las RDC de VH y VL se denomina región marco (en adelante denominada RM).

El anticuerpo humanizado puede producirse mediante construcción del ADNc codificante de una secuencia de aminoácidos de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de las RDC en VH de un animal no humano y las secuencias de aminoácidos de las RM en VH de un anticuerpo humano y construyendo además un ADNc codificante de una secuencia de aminoácidos de VL que comprende las secuencias de aminoácidos de las RDC en VL de un animal no humano y las secuencias de aminoácidos de RM en VL de un anticuerpo humano; insertándolas en un vector de expresión para células animales que comprende los ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano, construyendo de esta manera un vector de expresión de anticuerpo humanizado, e introduciendo después el vector de expresión en una célula animal para expresar el anticuerpo humanizado.

El anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo natural en el cuerpo humano aunque incluye además anticuerpos obtenidos de una biblioteca fágica de anticuerpos humanos o de un animal transgénico productor de

anticuerpos humanos, que se prepara basándose en los últimos avances en las técnicas de ingeniería genética, de ingeniería celular y de ingeniería del desarrollo.

El anticuerpo existente en el cuerpo humano puede prepararse, por ejemplo, mediante aislamiento de un linfocito de sangre periférica humana, inmortalizándolo mediante infección con virus de EB o similar y clonándolo después para obtener de esta manera linfocitos capaces de producir el anticuerpo humano, cultivando los linfocitos obtenidos de esta manera y purificando el anticuerpo humano a partir del cultivo.

La biblioteca fágica de anticuerpos humanos es una biblioteca en la que se expresan fragmentos de anticuerpos, tales como Fab y scFv sobre la superficie fágica mediante la inserción de un gen codificante de un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen fágico.

Puede recuperarse a partir de la biblioteca un fago que expresa el fragmento de anticuerpo que presenta la actividad de unión a antígeno deseada, utilizando su actividad de unión al sustrato con antígeno inmovilizado a modo de índice. El fragmento de anticuerpo puede convertirse adicionalmente en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

Un animal transgénico productor de anticuerpo humano es un animal en el que se ha integrado en las células el gen de anticuerpo humano. Específicamente, un animal transgénico productor de anticuerpo humano puede prepararse mediante la introducción de un gen codificante de un anticuerpo humano en una célula ES de ratón, injertando la célula ES en un embrión de estadio temprano de otro ratón, desarrollándola después.

El anticuerpo humano se prepara a partir de un animal no humano transgénico productor de anticuerpo humano mediante la obtención de un hibridoma producto de anticuerpo humano mediante un método de preparación de hibridoma habitualmente llevado a cabo en mamíferos no humanos, cultivando el hibridoma obtenido y formando y acumulando el anticuerpo humano en el cultivo.

En la variante de anticuerpo de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de VH y VL pueden ser cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VH y VL en un anticuerpo humano, las secuencias de aminoácidos de VH y VL en un anticuerpo animal no humano o secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humanizado en el que las RDC de un animal no humano han sido injertadas en el marco de un anticuerpo humano.

Entre los ejemplos específicos se incluyen las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo animal no humano producido por un hibridoma, secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humanizado, secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humano, y similares.

La secuencia de aminoácidos de CL en la variante de anticuerpo de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano o una secuencia de aminoácidos de un animal no humano, aunque preferentemente es C_k o C_λ de una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.

Como CH de la variante de anticuerpo, puede utilizarse cualquier CH, con la condición de que pertenezca a una inmunoglobulina humana (Ig_h) y resultan preferentes las pertenecientes a la clase IgG_h y puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG_h, tales como γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3) y γ4 (IgG4).

Además, la secuencia de aminoácidos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente exposición incluye no sólo una secuencia de CH de inmunoglobulina natural (incluyendo los alotipos en cada subclase), sino también una secuencia de CH de tipo quimérico que combina dos o más secuencias de CH de inmunoglobulina naturales y otras secuencias de aminoácidos de CH en las que se introduce una sustitución de aminoácido con el fin de regular la actividad efectora del anticuerpo.

Entre los ejemplos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluye una CH que comprende una variante de Fc en la que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Asn por un residuo de aminoácido diferente de Ser/Thr, la sustitución del aminoácido Thr por Pro y la sustitución del aminoácido Thr por otro residuo de aminoácido, en Asn, Thr y Thr en las posiciones 392, 393 y 394 según el índice EU, respectivamente, en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1.

Entre los ejemplos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen una CH que comprende una variante de Fc en la que, en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Asn en la posición 392 según el índice EU por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr y Trp, la sustitución de aminoácido Thr en la posición 393 según el índice EU por Pro y la sustitución del aminoácido Thr en la posición 394 según el índice EU por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Trp y Tyr, y similares.

Entre los ejemplos más específicos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen una

CH que comprende una variante de Fc en la que Asn en la posición 392 según el índice EU en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por Lys.

Además, entre los ejemplos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluye una CH que comprende una variante de Fc en la que Thr en la posición 339 según el índice EU en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 se sustituye por Tyr además de las sustituciones de aminoácidos anteriormente indicadas, una CH que comprende una variante de Fc en la que Met en la posición 397 según el índice EU en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 1 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe además de las sustituciones de aminoácidos anteriormente indicadas.

Además, entre los ejemplos de la CH de la variante de anticuerpo de la exposición se incluyen una CH que comprende CH1 derivada de IgG1 humana y un dominio bisagra como dominio CH diferente de la región Fc.

Entre los ejemplos de la CH de la variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen la CH que comprende una CH1 y un dominio bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo IgG1 en el que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Asn por un residuo de aminoácido diferente de Ser/Thr, la sustitución del aminoácido Thr por Pro y la sustitución del aminoácido Thr por otro residuo de aminoácido de entre Asn, Thr y Thr en las posiciones 392, 393 y 394 según el índice EU, respectivamente, de la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1; la CH en la que se lleva a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Thr por Pro y la sustitución del aminoácido Thr por otro residuo de aminoácido de entre Asn, Thr y Thr en las posiciones 392, 393 y 394 según el índice EU, respectivamente, de la CH de SEC ID nº 2, y similares.

La "actividad efectora" se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que se induce mediante una región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conoce una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (actividad CDC) y una fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad ADP) mediante células fagocíticas, tales como macrófagos o células dendríticas, y similares.

En la presente invención, puede medirse la actividad CDC y la actividad ADCC utilizando un método de medición conocido [Cancer Immunol. Immunother. 36:373, 1993].

La actividad ADCC se refiere a una actividad de inducción de la citotoxicidad para las células diana mediante la activación de células inmunológicas (tales como células asesinas naturales) debido a la unión de un anticuerpo unido a antígeno sobre la superficie de la célula diana con un receptor de Fc de una célula inmunológica mediante la región Fc del anticuerpo.

El receptor de Fc (en adelante denominado FcR) es un receptor que se une a una región Fc de un anticuerpo e induce diversas actividades efectoras debido a la unión al anticuerpo.

El FcR corresponde a la subclase del anticuerpo. IgG, IgE, IgA e IgM se unen específicamente a FcγR, FcεR, FcαR y FcμR, respectivamente.

Además, el FcγR incluye subtipos tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) y entre dichos subtipos se incluyen isoformas, es decir FcγRIA, FcγRIB, FcγRIC, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB, respectivamente.

Estos diferentes subtipos se expresan sobre diferentes tipos celulares (Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991).

En el ser humano, FcγRIIIB se expresa específicamente sobre los neutrófilos; FcγRIIIA se expresa sobre los monocitos, las células asesinas naturales (células NK) y una parte de las células T. La unión a un anticuerpo mediante FcγRIIIA induce la actividad ADCC dependiente de las células NK.

La actividad CDC se refiere a una actividad en la que un anticuerpo unido a su antígeno sobre una célula diana daña la célula diana mediante la activación de una cascada (ruta de activación del complemento) que comprende un grupo de proteínas relacionadas con el complemento en la sangre. Además, puede inducir la migración y la activación de inmunocitos por los fragmentos proteicos producidos mediante la activación del complemento.

La cascada de la actividad CDC se inicia mediante la formación de un complejo C1 mediante la unión de C1q que comprende un dominio de unión con la región Fc del anticuerpo a la región Fc y la unión del mismo a dos serina proteasas, C1r y C1s.

Las variantes de anticuerpo de la presente exposición en las que las cadenas de azúcar unidas a los residuos Asn en posiciones diferentes de la posición 297 unidas a la región Fc han sido reducidas o eliminadas presentan una actividad efectora, una actividad de unión a C1q, una actividad de unión a FcR y una actividad ADCC y/o una actividad CDC que son iguales o superiores a las de los anticuerpos en los que las cadenas de azúcar se unen a los

residuos Asn en una posición diferente de la posición 297.

Además, la composición de variante de anticuerpo de la invención presenta una actividad de unión a C1q, una actividad de unión a FcR y una actividad ADCC y/o CDC que son sustancialmente iguales o superiores a las del anticuerpo antes de la sustitución de aminoácido (al que también se denomina anticuerpo parental).

La expresión "presenta sustancialmente actividad de unión a C1q, actividad de unión a FcR y actividad ADCC y/o CDC que son iguales o superiores a las del anticuerpo parental" se refiere a que por lo menos una de las actividades seleccionadas de entre actividad de unión a FcR, actividad ADCC y actividad CDC son iguales o superiores a las actividades del anticuerpo parental en el caso de que las variantes de anticuerpo de la invención y el anticuerpo parental se analicen simultáneamente bajo las mismas condiciones experimentales.

La expresión "sustancialmente igual que la actividad del anticuerpo parental antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido" se refiere a que, en el caso de que la actividad del anticuerpo parental se considere el 100%, la actividad de las variantes del anticuerpo son de preferentemente 75%, más preferentemente 80%, más preferentemente 85%, todavía más preferentemente 90%, todavía más preferentemente 95%, todavía más preferentemente 96%, todavía más preferentemente 97%, todavía más preferentemente 98%, particularmente preferentemente 99% y todavía más preferentemente 100% o más. Además, la expresión "igual o superior en comparación con la actividad del anticuerpo parental antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácidos" se refiere a que presenta una actividad de preferentemente 100%, más preferentemente de 110%, todavía más preferentemente de 120%, todavía más preferentemente de 130%, particularmente preferentemente de 140%, y todavía más preferentemente de 150% o más.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las variantes de anticuerpo de la presente invención pueden controlar la actividad de unión a C1q, la actividad de unión a FcR y la actividad ADCC y/o CDC de las variantes de anticuerpo y también pueden reducir o eliminar las cadenas de azúcar que se unen a los residuos Asn en posiciones diferentes de la posición 297 llevando a cabo por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Asn por otro residuo de aminoácido, la sustitución del aminoácido X por Pro y la sustitución del aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU.

Además, en las composiciones de variante de anticuerpo de la presente invención, la cantidad del polímero (producto de asociación) y/o la cantidad de productos de degradación del anticuerpo contenidos en la composición son reducidos. El polímero se refiere a un producto en el que se polimerizan dos o más de las moléculas (monómeros) de anticuerpo mediante un enlace tal como un enlace hidrofóbico, un enlace de hidrógeno y similares, y entre los ejemplos se incluyen un dímero, un trímero, un oligómero en el que se han polimerizado varias moléculas, un polímero en el que se han polimerizado varias o más moléculas, y similares.

Además, en ocasiones se hace referencia al polímero como agregado. Además, el producto de degradación del anticuerpo puede ser cualquier sustancia con la condición de que sea un producto de degradación de una molécula de anticuerpo que puede producirse enzimáticamente o no enzimáticamente, y entre los ejemplos se incluyen un anticuerpo fragmentado, un producto oxidado, un producto de desamidación, un producto de isomerización y similares.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la composición de variante de anticuerpo de la presente exposición que contiene por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre la sustitución del aminoácido Asn por otros residuos de aminoácidos, la sustitución del aminoácido X por Pro y la sustitución del aminoácido Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en la secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en posiciones diferentes de la posición 297 según el índice EU, resulta útil como preparación farmacéutica de anticuerpos ya que la cantidad de polímero y/o la cantidad de producto de degradación de variante de anticuerpo durante la preparación y producción del anticuerpo es reducida. Entre los ejemplos más específicos de la composición de variante de anticuerpo se incluyen la composición de variante de anticuerpo en la que el residuo de aminoácido en la posición 392 según el índice EU se sustituye por Lys.

El fragmento de anticuerpo en la presente invención incluye Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende RDC y similares.

Un Fab es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50.000 y que presenta actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de IgG con una proteasa, la papaína (que corta un residuo de aminoácido de la cadena H en la posición 224), se encuentra unidos entre sí mediante un enlace disulfuro (enlace S-S).

Un F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a antígeno y que presenta un peso molecular de aproximadamente 100.000, que es algo mayor que un fragmento en el que Fab se encuentra unido mediante un enlace S-S en la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de IgG con una

proteasa, la pepsina (que corta un residuo de aminoácido de la cadena H en la posición 234).

Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50.000 y que presenta actividad de unión a antígeno, que se obtiene mediante el corte de un enlace S-S en la región bisagra de F(ab')₂.

Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena VH y una cadena VL se unen utilizando un conector peptídico (P) apropiado que presenta 12 o más residuos y es un fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a antígeno.

Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo que forma un dímero que comprende dos scFv con igual o diferente especificidad de unión a antígeno, y el diacuerpo presenta actividad de unión a antígeno divalente al mismo antígeno o dos actividades de unión a antígeno específicas a diferentes antígenos.

Un dsFv se obtiene mediante la unión de polipéptidos en los que un residuo de aminoácido de cada uno de VH y VL se sustituye por un residuo de cisteína mediante un enlace S-S entre los residuos de cisteína.

Un péptido que comprende un RDC se constituye mediante la inclusión de por lo menos una o más regiones RDC de VH o de VL. Puede producirse un péptido que comprende una pluralidad de RDC mediante la unión directa o mediante un conector peptídico apropiado.

El péptido que comprende un RDC puede producirse mediante la construcción de ADN codificante de RDC de VH y de VL de la variante de anticuerpo de la presente invención, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, introduciendo seguidamente el vector de expresión en un procariota o un eucariota para expresar el péptido. El péptido que comprende un RDC también puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como el método de Fmoc o el método de tBoc.

La composición de variante de anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpo que presentan cualquier especificidad y preferentemente es el anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con alergia o inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad autoinmunitaria o un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección vírica o bacteriana, y más preferentemente el anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor.

El antígeno relacionado con un tumor incluye CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD30, CD32, CD33, CD38, CD40, ligando de CD40 (CD40L), CD44, CD45, CD46, CD47, CD52, CD54, CD55, CD59, CD63, CD64, CD66b, CD69, CD70, CD74, CD80, CD89, CD95, CD98, CD105, CD134, CD137, CD138, CD147, CD158, CD160, CD162, CD164, CD200, CD227, adrenomedulina, proteína 4 relacionada con la angiopoyetina (ARP4), aurora, B7-H1, B7-DC, integrina, antígeno estromal 2 de la médula ósea (BST2), CA125, CA19.9, anhidrasa carbónica 9 (CA9), cadherina, receptor 4 de quimocina cc (CCR), CCR7, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico rico en cisteínas (CFR-1), c-Met, c-Myc, colágeno, CTA, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), CTLA-4, citoqueratina-18, DF3, E-caderina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, EGFR2 (HER2), EGFR3 (HER3), EGFR4 (HER4), factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico ligante de heparina (HB-EGF), endoglin, molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), receptor de proteína C endotelial (EPCR), efrina, receptor de efrina (Eph), EphA2, endoteliasa-2 (ET2), FAM3D, proteína activadora de fibroblastos (FAP), homólogo 1 de receptor de Fc (FcRH1), ferritina, factor 8 de crecimiento fibroblástico (FGF-8), receptor de FGF8, FGF básico (bFGF), receptor de bFGF, receptor de FGF (FGFR) 3, FGFR4, FLT1, FLT3, receptor del folato, homólogo Frizzled 10 (FZD10), receptor Frizzled 4 (FZD-4), G250, receptor de G-CSF, gangliósido (tal como GD2, GD3, GM2 y GM3), globo H, gp75, gp88, GPR-9-6, heparanasa I, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), receptor de HGF, antígeno HLA (tal como HLA-DR), HM1.24, glóbulo de grasa láctea humana (HMFG), hRS7, proteína 90 de choque térmico (hsp90), epítipo idiótipo, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), receptor de IGF (IGFR), interleucina (tal como IL-6, IL-12 e IL-15), receptor de interleucina (tal como IL-2R, IL-3R, IL-6R, IL-10R e IL-15R), integrina, factor 4 asociado a traslocación de receptor inmunológico (IRTA-4), calicreína 1, KDR, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KS1/4, lamp-1, lamp-2, laminina-5, Lewis y, sialil-Lewis x, receptor de linfotóxina beta (LTBR), LUNX, proteoglicano condroitín sulfato asociado al melanoma (MCSP), mesotelina, MICA, receptor de tipo II de sustancia inhibidora mulleriana (MISIR), mucina, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), Necl-5, Notch1, osteopontina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de PDGF, factor 4 de plaquetas (PF-4), fosfatidilserina, antígeno específico prostático (PSA), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno membranar específico de la próstata (PSMA), proteína/péptido relacionado con hormona paratiroidea (PTHrP), activador de receptor de ligando NF-kappaB (RANKL), receptor de la motilidad mediada por el ácido hialurónico (RHAMM), ROBO1, SART3, semaforina 4B (SEMA4B), inhibidor secretorio de proteasas de leucocitos (SLPI), SM5-1, esfingosina-1-fosfato, glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), receptor de transferrina (TfR), TGF-beta, Thy-1, Tie-1, receptor de Tie2, dominio de inmunoglobulina de células T y dominio 1 de la mucina (TIM-1), factor tisular humano (hTF), antígeno Tn, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor de TNF, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptor de TRAIL (tal como DR4 y DR5), transportador 2 de aminoácidos del sistema ASC (ASCT2), trkC, TROP-2, receptor

TWEAK Fn14, receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPAR), colagenasa de tipo IV, receptor de urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de VEGF (tal como VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), vimentina, VLA-4 y similares.

El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con tumor incluye el anticuerpo anti-GD2 [*Anticancer Res.* 13:331, 1993], anticuerpo anti-GD3 [*Cancer Immunol. Immunother.* 36:260, 1993], anticuerpo anti-GM2 [*Cancer Res.* 54:1511, 1994], anticuerpo anti-HER2 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992, patente EP nº 882794], anticuerpo anti-CD52 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992], anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-MAGE [*British J. Cancer* 83:493, 2000], anticuerpo anti-CCR4 (patente US nº 6.989.145, documento nº WO2009/086514), anticuerpo anti-HM1.24 [*Molecular Immunol.* 36:387, 1999, documento nº WO2002/057316], proteína relacionada con la anticuerpo anti-proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) [*Cancer* 88:2909, 2000], anticuerpo anti-factor de crecimiento fibroblástico básico, anticuerpo anti-factor 8 de crecimiento fibroblástico [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9911, 1989], anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento fibroblástico básico, anticuerpo anti-receptor del factor 8 de crecimiento fibroblástico [*J. Biol. Chem.* 265:16455, 1990], anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a la insulina [*J. Neurosci. Res.* 40:647, 1995], anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento similar a la insulina [*J. Neurosci. Res.* 40:647, 1995], anticuerpo anti-PSMA [*J. Urology* 160:2396, 1998], anticuerpo anti-VEGF [*Cancer Res.* 57:4593, 1997], anticuerpo anti-VEGFR [*Oncogene* 19:2138, 2000, documento nº WO96/30046], anticuerpo anti-c-Met (patente US nº 7.498.420), anticuerpo anti-CD20 [Rituxan (marca comercial registrada), *Curr. Opin. Oncol.* 10:548, 1998], patente US nº 5.736.137], anticuerpo anti-HER2 [Herceptin (marca comercial registrada), patente US nº 5.725.856], anticuerpo anti-HER3 (documentos nº WO2008/100624 y nº WO2007/077028), anticuerpo anti-Bip (documento nº WO2008/105560), anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-HB-EGF (documento nº WO2007/142277), anticuerpo anti-EGFR (Erbix (marca comercial registrada), documento nº WO1996/402010), anticuerpo anti-Apo-2R (documento nº WO98/51793), anticuerpo anti-ASCT2 (documento nº WO2010/008075), anticuerpo anti-5T4 (solicitud publicada de patente US nº 2006/0088522), anticuerpo anti-CA9 (patente US nº 7.378.091), anticuerpo anti-CEA [*Cancer Res.* 55 (23 supl):5935s-5945s, 1995], anticuerpo anti-LewisY, anticuerpo anti-receptor folato (documento nº WO2005/080431), anticuerpo anti-TROP-2 (patente US nº 6.794.494), anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD33 [Mylotag (marca comercial registrada)], anticuerpo anti-CD22 (Epratuzumab), anticuerpo anti-EpCAM, anticuerpo anti-A33, anticuerpo anti-IL-3R α (documento nº WO2010/126066), anticuerpo anti-uPAR (patente US nº 2008/0152587), anticuerpo de TRAIL2 (documento nº WO2002/94880) y similares.

El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con alergia o inflamación incluye el anticuerpo anti-interleucina 6 [*Immunol. Rev.* 127:5, 1992], el anticuerpo anti-receptor de interleucina 6 [*Molecular Immunol.* 31:371, 1994], el anticuerpo anti-interleucina 5 [*Immunol. Rev.* 127:5, 1992], el anticuerpo anti-receptor de interleucina 5, el anticuerpo anti-interleucina 4 [*Cytokine* 3:562, 1991], el anticuerpo anti-receptor de interleucina 4 [*J. Immunol. Meth.* 217:41, 1998], el anticuerpo anti-receptor de interleucina 10 (IL-10R) (documento nº WO2009/154995), el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [Hybridoma 13:183, 1994], el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [*Molecular Pharmacol.* 58:237, 2000], el anticuerpo anti-CCR4 [*Nature* 400:776, 1999], el anticuerpo anti-CCR5, el anticuerpo anti-CCR6, el anticuerpo anti-quimocina [Peri et al., *J. Immuno. Meth.* 174:249-257, 1994], el anticuerpo anti-receptor de quimocina [*J. Exp. Med.* 186:1373, 1997] o similares. El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular incluye el anticuerpo anti-GpIb/IIa [*J. Immunol.* 152:2968, 1994], el anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas [*Science* 253:1129, 1991], el anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas [*J. Biol. Chem.* 272:17400, 1997], el anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea [*Circulation* 101:1158, 2000], el anticuerpo anti-IgE [Xolair (marca comercial registrada)], el anticuerpo anti-CD22 (Epratuzumab), el anticuerpo anti-BAFF (Belimumab), el anticuerpo anti- $\alpha\beta_3$, el anticuerpo anti- $\alpha\beta_7$ y similares.

El anticuerpo que reconoce el antígeno relacionado con la infección vírica o bacteriana incluye el anticuerpo anti-gp120 [*Structure* 8:385, 2000], el anticuerpo anti-proteína matricial 2 (M2) del virus influenza tipo A (documento nº WO2003/078600), el anticuerpo anti-CD4 [*J. Rheumatology* 25:2065, 1998], el anticuerpo anti-CCR5, el anticuerpo anti-verotoxina [*J. Clin. Microbiol.* 37:396, 1999] y similares.

Además, la variante de anticuerpo de la presente invención presenta actividad de unión a la proteína A.

La expresión "que presenta actividad de unión a la proteína A" implica que la composición de variante de anticuerpo puede purificarse mediante la utilización de la proteína A.

La actividad de unión a la proteína A puede medirse mediante ELIAS, resonancia del plasmón superficial o similar. Específicamente, se deja que la composición de anticuerpo reaccione con proteína A unida a fase sólida sobre una placa y después se deja reaccionar adicionalmente con un anticuerpo que reconoce los anticuerpos marcados de diversa manera y puede medirse la actividad de unión mediante la determinación de la composición de anticuerpo unida a la proteína A.

Una actividad de unión a proteína A similar a la del anticuerpo IgG1 se refiere a que al medir la actividad de unión o afinidad de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención o del anticuerpo IgG1 a la proteína A, la actividad de unión o afinidad de la actividad es sustancialmente similar a la del anticuerpo IgG1.

Además, se deja que la composición de anticuerpo reaccione con la proteína A unida a un portador, tal como sefarosa, bajo condiciones de pH elevado, tal como un pH de entre aproximadamente 5 y 8, seguido de lavado, y después puede medirse la actividad de unión determinando la composición de anticuerpo eluida bajo condiciones de pH bajo, tal como un pH de entre aproximadamente 2 y 5.

Es prácticamente desconocido que las cadenas de azúcar se unan a otros residuos Asn en posiciones diferentes de la posición 297 en la región Fc del anticuerpo, aunque las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido se unen al residuo Asn en la posición 297 de la región Fc de la molécula del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, en general se unen dos cadenas de azúcar por cada molécula de anticuerpo.

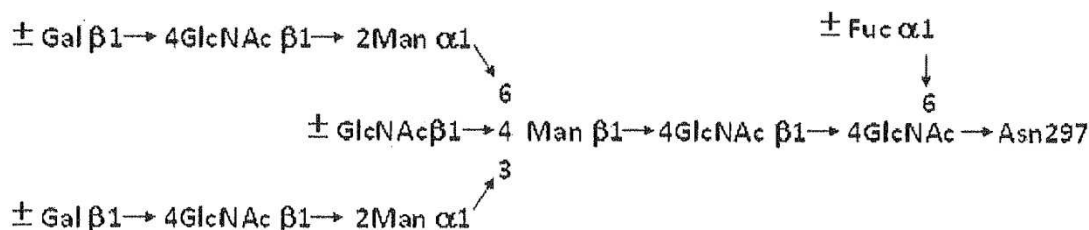
La cadena de azúcar unida a N-glucósido que se une al residuo Asn en la posición 297 de la región Fc incluye una cadena de azúcar de tipo complejo en la que el lado terminal no reductor de la estructura nuclear (estructura nuclear trimanosilo) comprende una o una pluralidad de cadenas laterales paralelas de galactosa-N-acetilglucosamina (en adelante denominada "Gal-GlcNAc") y el lado terminal no reductor de Gal-GlcNAc comprende además una estructura de ácido siálico, N-acetilglucosamina bisectante o similar.

En la presente invención, una fucosa o α 1,6-fucosa nuclear se refiere a una estructura sacárida en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina (en adelante denominada GlcNAc) en el extremo reductor mediante enlace α en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido. Además, se hace referencia a la cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar compleja unida mediante N-glucósido como no presentando fucosa o como cadena de azúcar sin una fucosa nuclear.

Además, en la presente invención, la estructura nuclear o la estructura nuclear trimanosilo se refiere a una estructura Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc.

En la presente invención, la cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se representa mediante la fórmula siguiente:

[Fórm. quím. 1]



La composición de variante de anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo que presenta la misma estructura de cadena de azúcar o una molécula de anticuerpo que presenta diferentes estructuras de cadena de azúcar, con la condición de que sea una molécula de anticuerpo en la que la cadena de azúcar unida a N-glucósido se une al residuo Asn en la posición 297 de la región Fc y presenta la estructura de cadena de azúcar anteriormente indicada.

Es decir, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se refiere a una composición que comprende moléculas de variante de anticuerpo según se reivindica que presenta la misma o diferentes estructuras de cadena de azúcar (en la figura 1 se muestra una estructura típica de cadena de azúcar de tipo complejo).

Además, entre las composiciones de variante de anticuerpo de la presente invención, la composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo con una región Fc en la que se encuentra unida una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo al residuo Asn en la posición 297 y que presenta cadenas de azúcar sin fucosa nuclear entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo que se unen a Fc contenido en la composición, presenta una actividad ADCC elevada además de actividad CDC.

Como proporción de cadenas de azúcar sin fucosa nuclear se incluyen anticuerpos con cualquier proporción, con la condición de que se incremente la actividad ADCC del anticuerpo. La proporción preferentemente es de 20% o superior, más preferentemente de entre 51% y 100%, todavía más preferentemente de entre 80% y 100%, particularmente preferentemente de entre 90% y 99%, y todavía más preferentemente de 100%.

En la presente invención, la cadena de azúcar sin fucosa nuclear puede presentar cualquier estructura de cadena de azúcar en el extremo terminal no reductor, con la condición de que la fucosa no se encuentre unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en la fórmula anteriormente indicada.

En la presente invención, el caso de fucosa no unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en la cadena de azúcar (sin fucosa nuclear) se refiere a que la fucosa no se encuentra sustancialmente unida. Una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se encuentra sustancialmente unida se refiere específicamente a una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se detecta sustancialmente, es decir, el contenido de fucosa es inferior al límite de detección, al someterla al análisis de cadenas de azúcar indicado en 4, posteriormente. Una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se encuentra unida a N-acetilglucosamina en los extremos reductores de todas las cadenas de azúcar presenta la actividad ADCC más alta.

La proporción de moléculas de anticuerpo con cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor en las cadenas de azúcar contenidas en la composición que comprende una molécula de anticuerpo con cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo en Fc puede determinarse liberando las cadenas de azúcar de la molécula de anticuerpo utilizando un método conocido, tal como hidrazinolisis o digestión enzimática [Biochemical Experimentation methods 23 - Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi, 1989], realizando el marcaje de fluorescencia o marcaje radioisotópico de las cadenas de azúcar liberadas y después separando las cadenas de azúcar marcadas mediante cromatografía.

Además, la proporción de moléculas de anticuerpo con cadenas de azúcar en las que la fucosa no se encuentra unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor en las cadenas de azúcar contenidas en la composición que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo en la región Fc puede determinarse mediante análisis de las cadenas de azúcar liberadas utilizando el método HPAED-PAD [J. Liq. Chromatogr. 6:1577, 1983].

El transformante productor de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede obtenerse introduciendo en una célula animal un vector de expresión de composición de variante de anticuerpo en el que se han insertado ADN codificantes de una región variable y una región constante de una molécula de anticuerpo.

El vector de expresión de variante de anticuerpo se construye tal como se indica posteriormente.

Cada uno de los ADN anteriormente indicados codificantes de CH y CL se introduce en un vector para la expresión de variante de anticuerpo para producir un vector de expresión de composición de variante de anticuerpo.

El vector para la expresión de variante de anticuerpo incluye pAGE107 (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 22979/91; Miyaji H. et al., Cytotechnology 3:133-140, 1990), pAGE103 (Mizukami T. e Itoh S., J. Biochem. 101:1307-1310, 1987), pHSG274 (Brady G. et al., Gene 27:223-232, 1984), pKCR (O'Hare K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527-1531, 1981), pSG1βd2-4 (Miyaji H. et al., Cytotechnology 4:173-180, 1990) y similares.

El promotor y el intensificador utilizados como vector para la expresión de variante de anticuerpo incluyen el promotor temprano e intensificador de SV40 (Mizukami T. e Itoh S., J. Biochem. 101:1307-1310, 1987), el promotor y el intensificador de RTL del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:960-968, 1987), promotor de cadena H de inmunoglobulina (Mason J.O. et al., Cell 41:479-487, 1985) e intensificador de la misma (Gillies S.D. et al., Cell 33:717-728, 1983), y similares.

El vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo puede ser de un tipo en el que los genes codificantes de la cadena H y de la cadena L se encuentran presentes en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes se encuentran en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de composición de variante de anticuerpo, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L de un anticuerpo en las células animales, resulta más preferente el tipo tándem del vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo (Shitara K. et al., J. Immunol. Methods 167:271-278, 1994).

El vector de tipo tándem para la expresión de la composición de variante de anticuerpo incluye pKANTEX93 (documento nº WO97/10354), pEE18 (Bentley K.J. et al., Hybridoma 17:559-567, 1998) y similares.

Los ADNc codificantes de VH y VL de los anticuerpos para los diversos antígenos se clonan cadena arriba de los ADN codificantes de CH y CL del vector construido para la expresión de la composición de variante de anticuerpo, construyendo de esta manera el vector de expresión de la composición de variante de anticuerpo.

Un método para introducir el vector de expresión en una célula anfitriona incluye la electroporación (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 257891-90; Miyaji H. et al., Cytotechnology 3:133-140, 1990) y similares.

La célula anfitriona productora de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier célula anfitriona utilizada generalmente en la producción de una proteína recombinante, tal como una célula animal, una célula vegetal o un microorganismo.

La célula anfitriona productora de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención incluye una célula CHO derivada de un tejido ovárico de hámster chino, una célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de línea celular de mieloma de rata, una célula NS0 de línea celular de mieloma de ratón, una célula SP2/0-Ag14 de mieloma de ratón, una célula BHK derivada de un tejido renal de hámster sirio, una célula Namalwa de línea celular de leucemia humana, una célula PER.C6 derivada de retinoblastoma humano, una célula HEK 293 derivada de tejido renal embrionario, una célula NM-F9 derivada de leucemia mieloide humana, una célula madre embrionaria, una célula de huevo fertilizado y similares.

Como célula anfitriona, resultan preferibles una célula anfitriona para producir una composición farmacéutica que comprende una glucoproteína recombinante, una célula madre embrionaria o una célula de huevo fertilizado para producir un animal transgénico no humano que produce una composición farmacéutica que comprende una glucoproteína recombinante, una célula vegetal para producir una planta transgénica que produce una composición farmacéutica que comprende una glucoproteína recombinante, y similares.

Entre los ejemplos de la célula madre se incluyen una célula en la que se ha modificado un gen genómico de un enzima relacionado con la síntesis de la GDP-L-fucosa, un enzima relacionado con una modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de la cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo, o una proteína relacionada con el transporte de la GDP-L-fucosa al aparato de Golgi, o una célula antes de llevar a cabo la modificación génica. Por ejemplo, resultan preferibles las células siguientes.

Una célula madre de la célula NS0 incluye células NS0 dadas a conocer en referencias tales como Bio/Technology 10:169, 1992, y Biotechnol. Bioeng. 73:261, 2001. Además, entre los ejemplos se incluyen la línea celular NS0 (RCB0213) que está registrada en Riken Cell Bank o una subcepa preparada mediante la adaptación de dichas células en diversos medios sin suero.

Una célula madre de la célula SP2/0-Ag14 incluye la célula SP2/0-Ag14 dada a conocer en referencias tales como J. Immunol. 126:317, 1981; Nature 276:269, 1978, y Human Antibodies and Hybridomas 3:129, 1992. Además, entre los ejemplos se incluyen la célula SP2/0-Ag14 (ATCC nº CRL-1581), que está registrada en la ATCC, o una subcepa (tal como ATCC nº CRL-1581.1) preparada mediante la adaptación de dichas células en diversos medios sin suero.

Una célula madre de la célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster chino incluye una célula CHO dada a conocer en referencias tales como Journal of Experimental Medicine 108:945, 1958; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1275, 1968; Genetics 55:513, 1968; Chromosoma 41:129, 1973; Methods in Cell Science 18:115, 1996; Radiation Research 148:260, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1275, 1968; Cell 6:121, 1975; Molecular Cell Genetics, apéndice I, II (páginas 883 a 900).

Además, entre los ejemplos se incluyen la célula CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), que se encuentra registrada en la ATCC, la célula DUXB11 (ATCC nº CRL-9096), la célula Pro-5 (ATCC nº CRL-1781) y la célula CHO-S disponible comercialmente (fabricada por Lifetechnologies, nº de cat. 11619) o una subcepa preparada mediante la adaptación de dichas células en diversos medios sin suero.

Una célula madre de la célula de la línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 incluye una línea celular establecida utilizando una célula Y3/Ag1.2.3 (ATCC nº CRL-1631). Entre los ejemplos específicos se incluyen las células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 dadas a conocer en referencias tales como J. Cell. Biol. 93:576, 1982; Methods Enzymol. 73B:1, 1981. Además, entre los ejemplos e incluyen la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC nº CRL-1662) que se encuentra registrada en la ATCC o una subcepa preparada mediante adaptación de dichas células en diversos medios sin suero.

La célula anfitriona capaz de expresar una composición de variante de anticuerpo que presenta una actividad ADCC elevada así como una actividad CDC elevada incluye una célula anfitriona resistente a una lectina que reconoce una fucosa nuclear, tal como una célula anfitriona capaz de producir una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que presenta cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo en la región Fc, en la que la proporción de cadenas de azúcar en las que no se encuentra fucosa unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo que se unen a la región Fc contenida en la composición es de 20% o superior. Entre los ejemplos se incluyen células en las que la actividad de por lo menos una proteína indicada en (a) a (c) a continuación se encuentra reducida o anulada, y similares:

(a) un enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-L-fucosa, GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), Fx, GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (GFPP) y fucocinasa,

(b) un enzima relacionado con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo; α 1,6-fucosiltransferasa (FUT8),

(c) una proteína relacionada con el transporte de la GDP-L-fucosa al aparato de Golgi; transportador de la GDP-

L-fucosa.

Además, entre los ejemplos se incluye un enzima o una proteína transportadora que presenta una identidad de por lo menos 80% o superior, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, particularmente preferentemente de 97% o superior, y todavía más preferentemente de 99% o superior, al comparar la secuencia de aminoácidos con dichos enzimas o la proteína transportadora y se calcula utilizando un software de cálculo tal como BLAST [J. Mol. Biol. 215:403, 1990] o FASTA (Methods in Enzymology 183:63, 1990) y que presenta una actividad del enzima o del transportador.

Entre los ejemplos específicos de la célula anfitriona anteriormente indicada productora de las variantes de anticuerpo de la presente invención se incluyen una célula CHO en la que se inactiva un gen codificante de α 1,6-fucosiltransferasa (FUT8), una célula CHO en la que se inactiva un gen codificante de GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD), una célula CHO en la que se inactiva un gen codificante de transportador de GDP-L-fucosa, y similares (documentos nº WO02/31140 y nº WO03/85107).

El método para obtener una célula en la que la actividad enzimática anteriormente indicada se encuentra reducida o anulada puede ser cualquier método con la condición de que sea un método para reducir o anular la actividad enzimática objetivo. Entre los ejemplos se incluyen (a) a (e) a continuación:

(a) disrupción génica con diana en un gen codificante del enzima,

(b) introducción de un mutante dominante negativo de un gen codificante del enzima,

(c) introducción de una mutación en el enzima,

(d) supresión de la transcripción o traducción de un gen codificante del enzima,

(e) selección de una línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en una cadena de azúcar unida a N-glucósido, y similares.

Como lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en una cadena de azúcar con enlace N-glucósido, puede utilizarse cualquier lectina capaz de reconocer la estructura de cadena de azúcar. Entre los ejemplos específicos se incluyen la lectina LCA de lenteja (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), la PSA de lectina de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), la VFA de lectina de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*), AAL de lectina de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*) y similares.

La "célula resistente a una lectina" se refiere a una célula en la que el crecimiento no resulta inhibido por la presencia de una lectina a una concentración eficaz. La "concentración eficaz" es una concentración superior a la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación del genoma (en adelante denominada también línea celular parental), preferentemente igual a la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación del genoma, más preferentemente 2 a 5 veces, más preferentemente 10 veces, más preferentemente 20 o más veces la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación del gen genómico.

La concentración eficaz de lectina que no inhibe el crecimiento puede determinarse apropiadamente para cada línea celular. Habitualmente es de entre 10 μ g/ml y 10 mg/ml, preferentemente de entre 0,5 mg/ml y 2,0 mg/ml.

El animal transgénico utilizado según la presente invención incluye un animal transgénico en el que se modifica un gen del genoma de manera que se anula la actividad de un enzima relacionado con la síntesis de la GDP-L-fucosa, un enzima relacionado con la modificación de una fucosa nuclear de una cadena de azúcar en una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo o una proteína relacionada con el transporte de la GDP-L-glucosa al aparato de Golgi, y similares.

Entre los ejemplos específicos se incluyen un animal transgénico en el que se inactiva un gen codificante de la α 1,6-fucosiltransferasa, un animal transgénico en el que se inactiva un gen codificante de la GDP-manosa 4,6-deshidratasa, un animal transgénico en el que se inactiva un gen codificante del transportador de la GDP-L-fucosa.

La variante de anticuerpo de la presente invención incluye un conjugado de anticuerpo en el que un isótopo radioactivo, un agente que presenta un peso molecular bajo, un agente que presenta un peso molecular elevado, una proteína o un anticuerpo terapéutico se unen a la variante de anticuerpo o fragmento del mismo químicamente o utilizando un método de ingeniería genética.

Además, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede ser una composición farmacéutica en la que la variante de anticuerpo de la presente invención y el agente terapéutico siguiente, tal como

un agente con un peso molecular bajo, un agente que presenta un peso molecular elevado, un inmunoestimulante y una citocina se administran simultánea o secuencialmente, o un fármaco de combinación preparado mediante la mezcla de cada componente farmacéutico. El fármaco de combinación preparado mediante la mezcla de cada componente farmacéutico que comprende un anticuerpo de fusión en el que se une por lo menos un agente a la variante de anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención.

Además, tras preparar un kit farmacéutico que comprende cada agente, dichos agentes pueden administrarse en el paciente simultánea o secuencialmente, o pueden administrarse tras mezclar dichos agentes.

El conjugado de anticuerpo de la presente invención puede producirse mediante la conjugación química de un isótopo radioactivo, un agente que presenta un peso molecular bajo, un agente que presenta un peso molecular elevado, un inmunoestimulante, una proteína, un anticuerpo terapéutico o similar con el lado N-terminal o el lado C-terminal de una cadena H o una cadena L de la variante de anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención, un sustituyente apropiado o cadena lateral del anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención, además de una cadena de azúcar en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o similar [Antibody Engineering Handbook, publicado por Chijin Shokan, 1994].

Además, el conjugado de anticuerpo puede producirse genéticamente mediante la unión de un ADN codificante de la variante de anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención a otro ADN codificante de una proteína o un anticuerpo terapéutico que debe conjugarse, insertando el ADN en un vector para la expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula anfitriona apropiada.

El isótopo radioactivo incluye ^{111}I , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi y similares. El isótopo radioactivo puede conjugarse directamente con el anticuerpo mediante el método de la cloramina T o similar. Además, puede conjugarse con el anticuerpo una sustancia quelante del isótopo radioactivo.

El agente quelante incluye ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA) y similares.

El agente que presenta un peso molecular bajo incluye un agente antitumoral, tal como un agente alquilante, un agente nitrosoarea, un antagonista del metabolismo, una sustancia antibiótica, un alcaloide derivado de una planta, un inhibidor de topoisomerasa, un agente para la hormonoterapia, un antagonista de hormona, un inhibidor de aromatasa, un inhibidor de glucoproteína P, un derivado de complejo de platino, un inhibidor de la fase M y un inhibidor de cinasa [Rinsho Syuyo-gaku (Clinical Oncology), Gan to Karagaguryoho-Sha, 1996], un agente esteroide, tal como hidrocortisona y prednisona, un agente no esteroideo tal como la aspirina o la indometacina, un agente inmunorregulador tal como el aurotiomalato o la penicilamina, un agente inmunosupresor tal como la ciclofosfamida y la azatioprina, un agente antiinflamatorio tal como un agente antihistamínico, por ejemplo el maleato de clorfeniramina y la clemastina [Ensho to Kouensho-Ryoho (Inflammation and Anti-inflammation Therapy), Ishiyaku Shuppan, 1982] y similares.

Entre los ejemplos del agente antitumoral se incluyen amifostina (Ethyol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, gemcitabina (Gemsal), daunorubicina, procarbazona, lomustina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, daunomicina, peplomicina, estramustina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotea), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, idarubicina, mesna, irinotecán (CPT-11), nogitecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, hidroxycarbamida, plicamicina, mitotana, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, estreptozocina, tamoxifeno, goserelina, leuprorelina, flutamida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza uracilo, vinorelbina, clorambucilo, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, vindesina, nimustina, semustina, capecitabina, Tomudex, azacitidina, UFT, oxaliplatino, gefitinib (Iressa), imatinib (STI 571), elrotinib, inhibidor de tirosina cinasa (Flt3) de tipo FMS, inhibidor de receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), inhibidor de receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), inhibidor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tal como Iressa y Tarceva, radicol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, rapamicina, amsacrina, ácido retinoico todo-trans, talidomida, lenalidomida, anastrozol, fadrozol, letrozol, exemestano, tiomalato de oro, D-penicilamina, bucilamina, azatioprina, mizoribina, ciclosporina, rapamicina, hidrocortisona, bexaroteno (Targretin), tamoxifeno, dexametasona, sustancias progestina, sustancias estrógeno, anastrozol (Arimidex), Leuplin, aspirina, indometacina, celecoxib, azatioprina, penicilamina, tiomalato de oro, maleato de clorfeniramina, clorfeniramina, clemastina, tretinoína, bexaroteno, arsénico, voltezomib, alopurinol, caliqueamicina, ibritumomab tiuxetán, Targretina, ozogamina, claritromicina, leucovorina, ifosfamida, quetoconazol, aminoglutetimida, suramina, metotrexato, maitansinoide DM1, maitansinoide DM4 y derivados de los mismos, y similares.

El método para conjugar el agente con peso molecular bajo con el anticuerpo incluye un método en el que el agente y un grupo amino del anticuerpo se conjugan mediante glutaraldehído, un método en el que un grupo amino del agente y un grupo carboxilo del anticuerpo se conjugan mediante carbodiimida soluble en agua, y similares.

El agente que presenta un peso molecular elevado incluye polietilenglicol (en adelante denominado "PEG"), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de estireno-ácido maleico, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, hidroxipropilmetacrilamida, y similares.

5 Mediante la unión de dichos compuestos con un peso molecular elevado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se esperaban los efectos siguientes: (1) mejora de la estabilidad frente a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) prolongación notable de la semivida en sangre, (3) desaparición de la inmunogenicidad, supresión de la producción de anticuerpos, y similares [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten, 1993].

10 Por ejemplo, el método de unión de PEG a un anticuerpo incluye un método en el que se deja que reaccione un anticuerpo con un agente modificador de PEG [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shote, 1993].

El reactivo modificador de PEG incluye un agente modificador del grupo ϵ -amino de la lisina (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 178926/86), un agente modificador de un grupo carboxilo del ácido aspártico y el ácido glutámico (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 23587/81), un agente modificador de un grupo guanidino de la arginina (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 117920/90) y similares.

El inmunoestimulador puede ser cualquier producto natural conocido como inmunoadyuvante. Entre los ejemplos de un agente potenciador inmunogénico se incluyen $\beta(1\rightarrow3)$ glucano (lentinano, esquizofilano), α -galactosilceramida y similares.

La proteína incluye una citocina o un factor de crecimiento que activa una célula inmunocompetente, tal como una célula NK, un macrófago o un neutrófilo, una proteína tóxica y similares.

25 Entre los ejemplos de la citocina o del factor de crecimiento se incluyen el interferón (en adelante denominado "INF")- α , INF- β , INF- γ , interleucina (en adelante denominado "IL")-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), ligando Fas (FasL), ligando TRAIL (Apo2L) y similares.

30 La proteína tóxica incluye ricina, toxina diftérica, toxina diftérica atenuada, CRM197, ONTAK y similares, e incluye además una proteína tóxica en la que se introduce una mutación en una proteína con el fin de controlar la toxicidad.

El anticuerpo terapéutico incluye un anticuerpo contra un antígeno en el que se induce la apoptosis mediante la unión del anticuerpo, un anticuerpo contra un antígeno que participa en la formación del estado patológico del tumor, un anticuerpo que regula la función inmunológica y un anticuerpo relacionado con la angiogénesis en la parte patológica.

40 El antígeno en el que se induce la apoptosis mediante la unión del anticuerpo incluye un grupo de diferenciación (en adelante en la presente memoria, "CD") 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y similares.

45 El antígeno participante en la formación del estado patológico del tumor o el antígeno para el anticuerpo que regula la función inmunológica incluye CD40, ligando de CD40, molécula de la familia B7 (CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4), ligando de molécula de la familia B7 (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, BTLA), OX-40, ligando de OX-40, CD137, molécula de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (DR4, DR5, TNFR1, TNFR2), molécula de la familia del receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), molécula de la familia de receptores TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4), receptor activador del ligando del factor nuclear kappa B (RANK), ligando de RANK, CD25, receptor 4 del ácido fólico, citocina [IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β , TNF α , etc.], receptores of dichas citocinas, quimocina (SLC, ELC, I-309, TARC, MDC, CTACK, etc.) y receptores de dichas quimocinas.

50 El antígeno para el anticuerpo que inhibe la angiogénesis en la parte patológica incluye el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), EGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la eritropoyetina (EPO), TGF β , IL-8, efrina, SDF-1 y receptores de los mismos, y similares.

60 Un conjugado de anticuerpo con una proteína o anticuerpo terapéutico puede producirse uniendo un ADNc codificante de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo a un ADNc codificante de la proteína, construyendo un ADN codificante del anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o eucariota e introduciendo después el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el conjugado de anticuerpos.

65 En el caso en que el conjugado de anticuerpo anteriormente indicado se utilice para el método de detección, el método para la determinación cuantitativa, el reactivo de detección, el reactivo para la determinación cuantitativa o el

agente diagnóstico en la presente exposición, entre los ejemplos del agente de la variante de anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo incluye un marcaje utilizado en el método rutinario de detección o medición inmunológica.

- 5 El marcaje incluye enzimas tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa y la luciferasa, materiales luminiscentes tales como éster de acridinio y lofina, materiales fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametil-rodamina (RITC), y similares.

10 La variante de anticuerpo de la presente invención puede ser un agente terapéutico para cualquier enfermedad con la condición de que los antígenos que se unen específicamente a los anticuerpos sean expresados en enfermedades. El agente terapéutico para los cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias o enfermedades cardiovasculares anteriormente indicadas, o para enfermedades en las que se expresa un antígeno relacionado con la infección por un virus o microorganismo resulta preferible.

- 15 La variante de anticuerpo de la presente invención resulta eficaz para el tratamiento de una célula causal de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o similar, y a que el anticuerpo no presenta una unión innecesaria de una cadena de azúcar a la región Fc y presenta una actividad efectora elevada.

20 Entre los ejemplos de los cánceres se incluyen cáncer hematológico, cáncer de cabeza y cuello, glioma, cáncer de lengua, cáncer laríngeo, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pancreático (tal como el cáncer de la cabeza del páncreas, el cáncer del cuerpo pancreático, cáncer de la cola pancreática y cáncer ductal pancreático), cáncer del intestino delgado, cáncer de colon, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas), mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del conducto biliar, cáncer renal, cáncer uterino (tal como cáncer cervical y cáncer endometrial), cáncer ovárico, tumores de células germinales ováricas, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, osteosarcoma, cáncer de piel, enfermedades fúngicas, fungoides, sarcoma de Ewing, tumor óseo maligno, melanoma y similares.

30 Entre los ejemplos de cánceres hematológicos se incluyen la leucemia, la leucemia mielógena crónica, la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia linfocítica aguda, el cáncer derivado de las células T y similares. Entre los ejemplos específicos se incluyen el linfoma de células T cutáneo (LCTC), el linfoma de células T periférico (LCTP), el linfoma de células grandes anaplásico (LPGA), la leucemia linfocítica aguda (LLA), el mieloma múltiple, el linfoma de Hodgkin o el linfoma no Hodgkin (tal como el linfoma de Burkitt, el linfoma linfoblástico, el linfoma de células B grandes difuso, el linfoma de células grandes anaplásico, el linfoma MANTL y el linfoma folicular), y similares.

40 Entre los ejemplos de las enfermedades autoinmunitarias se incluyen la enfermedad de Hashimoto, la enfermedad de Graves, la púrpura trombocitopénica idiopática, la neutropenia idiopática, la anemia megaloblástica, la anemia hemolítica, la miastenia grave, la soriasis, el pénfigo, el penfigoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la espondilitis anquilosante, la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo I, la hepatitis, la miocarditis, el síndrome de Sjogren, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de anticuerpos antifosfolípido, la polimiositis, la dermatomiositis, la esclerosis sistémica cutánea, el rechazo postrasplante y similares.

45 Entre los ejemplos de las enfermedades alérgicas se incluyen la hipersensibilidad aguda o crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y similares.

Los procedimientos para producir la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se indica en detalle a continuación.

50 1. Procedimiento para producir composición de variante de anticuerpo

La composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante la expresión de la misma en una célula anfitriona utilizando los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (en adelante denominado "Antibodies"); Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press., 1993 (en adelante denominado "Monoclonal Antibodies"); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, 1996 (en adelante denominado "Antibody Engineering") y similares, por ejemplo de la manera siguiente.

60 (1) Construcción de un vector de expresión de composición de variante de anticuerpo de la presente invención.

El vector de expresión de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención es un vector de expresión para las células animales en el que se introducen genes codificantes de las regiones constantes de las cadenas H y L de la molécula de anticuerpo contenida en la composición de variante de anticuerpo de la presente invención.

El vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo puede construirse mediante clonación de cada uno de los genes codificantes de las regiones constantes de las cadenas H y L de la molécula de anticuerpo contenida en la composición de variante de anticuerpo en un vector para la expresión en células animales.

5 El gen codificante de la región constante de la cadena H de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede producirse mediante clonación de los genes codificantes de las regiones constantes de cadena H del anticuerpo IgG1, ligando después los fragmentos génicos codificantes de las secuencias de aminoácidos deseadas.

10 Además, el ADN total puede sintetizarse mediante la utilización de ADN sintéticos y la síntesis también puede llevarse a cabo mediante PCR (Molecular Cloning, segunda edición). Además, puede producirse mediante la combinación de dichas técnicas.

15 En la presente exposición, en los residuos de aminoácidos de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un aminoácido diferente de la prolina) en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU en la región Fc de un anticuerpo IgG humano, puede determinarse un residuo de aminoácido que debe sustituirse con cualquier residuo de aminoácido Asn, X y Ser/Thr considerando la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido.

20 Es decir, puede llevarse a cabo una sustitución de aminoácido apropiada tras considerar un sitio para la sustitución de aminoácido y un residuo de aminoácido tras la sustitución de manera que no se genere una nueva secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido como resultado de las sustituciones de aminoácidos. En la presente invención, específicamente puede determinarse el diseño de la manera siguiente.

25 En la región Fc de un anticuerpo humano (SEC ID nº 1) son ejemplos de la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299 según el índice EU son Asn-Thr-Thr en las posiciones 392 a 394. La secuencia de aminoácidos antes y después de dicha secuencia es Asn389-Asn390-Tyr391-Asn392-Thr393-Thr394-Pro395-Pro396 (ver la figura 4).

30 Al llevar a cabo la sustitución del aminoácido Asn392 por Ser/Thr, se generaría una nueva secuencia de consenso 390Asn-391Tyr-392Ser/Thr, ya que en la posición 390 se encuentra una Asn. Por lo tanto, la Asn392 se sustituye preferentemente por un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr y Trp. Además, la Thr393 se sustituye preferiblemente por Pro y 394Thr se sustituye preferiblemente por un residuo de aminoácido diferente de Ser/Thr.

35 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, puede determinarse el sitio apropiado de sustitución de aminoácido y el residuo de aminoácido apropiado mediante la consideración de los residuos de aminoácidos (1 a 3 residuos) que se encuentran presentes en las posiciones próximas a la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido y el diseño de la secuencia de aminoácidos posterior a las sustituciones de aminoácidos.

40 El vector de expresión para las células animales puede ser cualquier vector, con la condición de que pueda introducirse y expresarse el gen anteriormente indicado codificante de la región constante de una molécula de anticuerpo. Entre los ejemplos se incluyen pKANTEX93 [Mol. Immunol. 37:1035, 2000], pAGE107 [Cytotechnology 3:133, 1990], pAGE103 [J. Biochem. 101:1307, 1987], pHSG274 [Gene 27:223, 1984], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1527, 1981], pSG1βd2-4 [Cytotechnology 4:173, 1990] y similares.

45 Entre los promotores e intensificadores utilizados para el vector de expresión para células animales se incluyen el promotor temprano e intensificador del SV40 [J. Biochem. 101:1307, 1987], las RTL del virus de la leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:960, 1987], el promotor de la cadena H de inmunoglobulina [Cell 41:479, 1985] y el intensificador de la misma [Cell 33:717, 1983] y similares.

50 El vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede ser de un tipo en el que los genes codificantes de las cadenas H y L del anticuerpo, respectivamente, se encuentran presentes en vectores separados de un tipo en el que ambos genes se encuentran presentes en el mismo vector (en adelante denominado de tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción del vector de expresión de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención, la facilidad de introducción en las células animales y el equilibrio entre las cantidades expresadas de las cadenas H y L del anticuerpo en las células animales, resulta más preferente un tipo tándem de vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo (J. Immunol. Methods 167:271, 1994).

60 El vector de expresión de la composición de variante de anticuerpo construida de la presente invención puede utilizarse para la expresión del anticuerpo híbrido humano, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humano en las células animales.

(2) Obtención de ADNc codificante de la región V del anticuerpo animal no humano.

Los ADNc codificantes de una región variable de cadena H (en adelante denominada "VH") y de una región variable de cadena L (en adelante denominada "VL") de un anticuerpo animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón, pueden obtenerse de la manera siguiente.

Se sintetiza un ADNc mediante la utilización de ARNm extraído de una célula de hibridoma que produce cualquier anticuerpo como molde. El ADNc sintetizado se clona en un vector, tal como un fago o un plásmido con el fin de obtener una biblioteca de ADNc.

Cada uno de un fago recombinante o plásmido recombinante que comprende un ADNc codificante de VH y un fago recombinante o un plásmido recombinante que comprende un ADNc codificante de la región V de cadena L se aísla a partir de la biblioteca anteriormente indicada mediante la utilización del ADNc codificante de la región C o la región V de un anticuerpo de ratón conocido a modo de sonda.

Se determinan las secuencias de nucleótidos de longitud completa de VH y VL del anticuerpo de ratón de interés en el plásmido recombinante o el plásmido recombinante y se deducen las secuencias de aminoácidos de longitud completa de VH y VL a partir de las secuencias de nucleótidos.

Pueden obtenerse células de hibridoma productoras de cualquier anticuerpo derivado de un animal no humano mediante la inmunización de un animal no humano con un antígeno unido al anticuerpo, preparando hibridomas a partir de células productoras de anticuerpos del animal inmunizado y células de mieloma según un método conocido [Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (en adelante denominado "Antibodies"); Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press, 1993 (en adelante denominado "Monoclonal Antibodies"), Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, 1996 (en adelante denominado "Antibody Engineering"), seleccionando hibridomas clonados, cultivando los hibridomas seleccionados y purificando células separándolas del sobrenadante de cultivo.

Como el animal no humano puede utilizarse cualquier animal con la condición de que puedan prepararse células de hibridoma a partir del animal. Entre los animales adecuados se incluyen el ratón, la rata, el hámster y el conejo.

Entre los métodos para preparar ATN total a partir de una célula de hibridoma se incluyen el método del tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol. 154:3, 1987] y el kit RNeasy (fabricado por QIAGEN).

Entre los métodos para preparar ARNm a partir de ARN total se incluyen el método de columna de celulosa con oligo (dT) inmovilizado [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989].

Entre los ejemplos de kits para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma se incluyen el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) y el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

Entre los métodos para sintetizar ADNc y preparar la biblioteca de ADNc se incluyen métodos convencionales [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-34] o métodos que utilizan kits disponibles comercialmente.

Entre los ejemplos de los kits disponibles comercialmente se incluyen el sistema plásmido SuperScript (marca comercial registrada) para la síntesis de ADNc, el kit de clonación de plásmidos (fabricado por GIBCO BRL) y el kit de síntesis de ZAP-ADNc (fabricado por Stratagene).

Durante la preparación de la biblioteca de ADNc, el vector para integrar el ADNc sintetizado utilizando el ARNm extraído de una célula de hibridoma como molde puede ser cualquier vector con la condición de que pueda integrarse el ADNc.

Entre los ejemplos de vectores adecuados se incluyen ZAP Express [Strategies 5:58, 1992], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research 17:9494, 1989], λZAP II (fabricado por Stratagene), λgt10, λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach I:49, 1985], λambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983], pUC18 [Gene 33:103, 1985] y similares.

Como *Escherichia coli* para introducir la biblioteca de ADNc construida con un vector fago o plásmido, puede utilizarse cualquier *Escherichia coli* con la condición de que pueda introducirse, expresarse y mantenerse la biblioteca de ADNc.

Entre los ejemplos de *Escherichia coli* adecuados se incluyen XL1-Blue MRF [Strategies 5:81, 1992], C600 [Genetics 39:440, 1954], Y1088, Y1090 [Science 222:778, 1983], NM522 [J. Mol. Biol. 166:1, 1983], K802 [J. Mol. Biol. 16:118, 1966], JM105 [Gene 38:275, 1985] y similares.

Entre los métodos para seleccionar los clones de ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano a partir de la biblioteca de ADNc se incluyen la hibridación de colonias o la hibridación de placas [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989] utilizando una sonda marcada con isótopos o fluorescencia.

También resulta posible preparar los ADNc codificantes de VH y VL mediante la preparación de cebadores y realizando la PCR [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-34] utilizando el ADNc o biblioteca de ADNc como molde.

Las secuencias de nucleótidos de los ADNc seleccionados mediante los métodos anteriormente indicados pueden determinarse cortando los ADNc con enzimas de restricción apropiados, clonando los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) y analizando después las secuencias mediante métodos de análisis de secuencias de nucleótidos utilizados generalmente, tales como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977] o mediante la utilización de analizadores de la secuencia de nucleótidos tales como secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

La longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL se deducen de las secuencias de nucleótidos determinadas y se comparan con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991], en el que puede confirmarse que los ADNc obtenidos codifican secuencias de aminoácidos que comprenden completamente VH y VL del anticuerpo, incluyendo las secuencias de señal secretoria.

Además, en el caso de que ya se conozca la secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo o la secuencia de nucleótidos del ADN codificante de la región variable, puede obtenerse el ADN mediante los métodos siguientes.

En el caso de que se conozca la secuencia de aminoácidos, el ADN puede obtenerse mediante el diseño de una secuencia de ADN codificante de la región variable considerando la frecuencia de uso de los codones [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991], la síntesis de varios ADN sintéticos que constituyen aproximadamente 100 a 150 nucleótidos basándose en la secuencia de ADN diseñada y llevan a cabo una PCR utilizando los ADN sintéticos o sintetizando la longitud completa de la secuencia de ADN. En el caso de que se conozca la secuencia de nucleótidos, puede obtenerse el ADN mediante el mismo método indicado anteriormente.

(3) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V de un anticuerpo de un animal no humano.

Mediante la comparación de la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo, incluyendo secuencias de señal secretoria con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991], resulta posible deducir la longitud de las secuencias de señal secretoria y las secuencias de aminoácidos N-terminales y además para conocer el subgrupo al que pertenece el anticuerpo. Además, las secuencias de aminoácidos de las RDC de VH y VL pueden deducirse de una manera similar.

(4) Construcción de un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano.

Puede construirse un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano mediante la inserción de los ADNc codificantes de VH y VL del anticuerpo de un animal no humano en sitios cadena arriba de los genes codificantes de CH y CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo indicada en (1), anteriormente.

Por ejemplo, el vector de expresión del anticuerpo híbrido humano puede construirse mediante la ligación de los ADNc codificantes de VH y VL del anticuerpo de un animal no humano, respectivamente, a ADN sintéticos que comprenden las secuencias de nucleótidos 3'-terminales de VH y VL de un anticuerpo de un animal no humano y las secuencias de nucleótidos 5'-terminales de CH y CLV de un anticuerpo humano y que también presentan secuencias de reconocimiento para los enzimas de restricción apropiados en ambos extremos, y la inserción en sitios cadena arriba de los genes codificantes de CH y CLV del anticuerpo humano en el vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo indicada en 1 (1), anteriormente, de manera que se expresen en una forma apropiada.

(5) Construcción de ADNc codificante de la región V de un anticuerpo humanizado.

Los ADNc codificantes de VH y VL del anticuerpo humanizado pueden construirse de la manera siguiente. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de las RM de VH y VL del anticuerpo humano para la injertación de las RDC de VH y VL del anticuerpo derivado de un animal no humano.

Las secuencias de aminoácidos de las RM de VH y VL del anticuerpo humano pueden ser cualesquiera de entre las de los anticuerpos humanos. Entre las secuencias adecuadas se incluyen las secuencias de aminoácidos de las RM de las VH y VL de los anticuerpos humanos registrados en bases de datos tales como la Protein Data Bank y las secuencias de aminoácidos comunes a subgrupos de RM de las VH y VL de los anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991].

Con el fin de preparar un anticuerpo humanizado con una actividad suficiente entre ellas, resulta preferente seleccionar secuencias de aminoácidos con una homología tan alta como resulte posible (por lo menos 60%) con las secuencias de aminoácidos de las RM de VH y VL del anticuerpo deseado derivado de un animal no humano.

A continuación, las secuencias de aminoácidos de las RDC de VH y VL del anticuerpo deseado derivado de un animal no humano se injertan en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las RM de VH y VL del anticuerpo humano para diseñar las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN considerando la frecuencia de uso de los codones en las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpo [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y se diseñan secuencias de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado. Se sintetizan por completo las secuencias de ADN diseñadas.

La clonación en el vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención construida en 1 (1), anteriormente, puede llevarse a cabo fácilmente mediante la introducción de secuencias de reconocimiento para los enzimas de restricción apropiados en los extremos 5'-terminales de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos. Tras la PCR, se clonan los productos de amplificación en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) y se determinan las secuencias de nucleótidos mediante el método indicado en 1 (2), anteriormente, para obtener un plásmido portador de secuencias de AND codificantes de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado deseado.

(6) Sustitución de la secuencia de aminoácidos de la región V de un anticuerpo humanizado.

Es conocido que un anticuerpo humanizado preparado meramente mediante injertación de las RDC de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las RM de VH y VL de un anticuerpo humano presenta una actividad de unión a antígeno más baja que el anticuerpo original derivado de animal no humano [Bio/Technology 9:266, 1991].

Lo anterior probablemente se debe a que en VH y VL del anticuerpo original derivado de un animal no humano, no sólo las RDC sino también algunos residuos de aminoácidos en las RM participan directa o indirectamente en la actividad de unión a antígeno, y dichos residuos de aminoácidos se sustituyen por residuos de aminoácidos de los RM de VH y VL del anticuerpo humano mediante injertación de las RDC.

Con el fin de resolver dicho problema, se han realizado intentos de preparación de un anticuerpo humanizado que eleve la baja actividad de unión a antígeno mediante la identificación de los residuos de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de las RM de VH y VL del anticuerpo humano que participan directamente en la unión a antígeno o que se relacionan indirectamente con la misma mediante la interacción con residuos de aminoácidos en las RDC o el mantenimiento de la estructura tridimensional del anticuerpo y mediante la modificación de dichos residuos de aminoácidos por los derivados del anticuerpo original derivado de un animal no humano [Bio/Technology 9:266, 1991].

Durante la preparación del anticuerpo humanizado resulta muy importante identificar eficientemente los residuos de aminoácidos en la RM que se relacionan con la actividad de unión a antígeno. Para la identificación eficiente, se ha llevado a cabo la construcción y análisis de las estructuras tridimensionales de los anticuerpos mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol. 112:535, 1977], el modelaje por ordenador [Protein Engineering 7:1501, 1994] y similares. Estos estudios de las estructuras tridimensionales han proporcionado mucha información útil para la preparación de anticuerpos humanizados.

Sin embargo, no existe ningún método establecido para preparar un anticuerpo humanizado que sea adaptable a cualquier tipo de anticuerpo. Es decir, actualmente todavía resulta necesario realizar enfoques de prueba y error, por ejemplo la preparación de varias sustituciones para cada anticuerpo y el examen de cada sustitución para la correlación con la actividad de unión a antígeno.

La sustitución de los residuos de aminoácidos en los RM de VH y VL de un anticuerpo humano puede llevarse a cabo mediante PCR tal como se ha indicado en 1 (5), anteriormente, utilizando ADN sintéticos para la sustitución. La secuencia de nucleótidos del producto de amplificación por PCR se determinó mediante el método indicado en 1 (2), anteriormente, para confirmar que se había realizado la sustitución deseada.

(7) Construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado.

El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede construirse mediante la inserción de los ADNc codificantes

de VH y VL del anticuerpo humanizado construido en 1 (5) y (6), anteriormente, en sitios cadena arriba de los genes codificantes de CH y CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención indicada en 1 (1), anteriormente.

Por ejemplo, el vector de expresión de anticuerpo humanizado puede construirse mediante la introducción de secuencias de reconocimiento de los enzimas de restricción apropiados en los extremos 5'-terminales de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos entre los ADN sintéticos utilizados para construir VH y VL del anticuerpo humanizado en 1 (5) y (6), anteriormente, e insertándolos en sitios cadena arriba de los genes codificantes de CH y CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo recombinante de la presente invención indicado en 1 (1), anteriormente, de manera que los expresen en una forma apropiada.

(8) Producción estable de un anticuerpo humanizado.

Los transformantes capaces de producir establemente el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado pueden obtenerse mediante la introducción de los vectores de expresión de anticuerpo híbrido humano o de anticuerpo humanizado indicados en 1 (4) y (7), anteriormente, en células animales apropiadas.

La introducción del vector de expresión de anticuerpo humanizado en una célula animal puede llevarse a cabo mediante electroporación [solicitud de patente no examinada publicada japonesa nº 257891/90; Cytotechnology 3:133, 1990] y similares.

Como célula animal para introducir el vector de expresión de anticuerpo híbrido humano o de anticuerpo humanizado, puede utilizarse cualquier célula animal capaz de producir el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado.

Entre los ejemplos específicos de las células animales se incluyen las líneas celulares de mieloma de ratón NS0 y SP2/0, células de ovario de hámster chino CHO/dhfr⁻ y CHO/DG44, las líneas celulares de mieloma de rata YB2/0 e IR983F, la célula BHK derivada de riñón de hámster chino y la línea celular de mieloma humano Namalwa. Resultan preferentes la célula de ovario de hámster chino CHO/DG44 y la línea celular de mieloma de rata YB2/0.

Tras la introducción del vector de expresión de anticuerpo híbrido humano o de anticuerpo humanizado, puede seleccionarse el transformante capaz de producir establemente el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado utilizando un método para el cultivo de células animales que contiene un agente tal como G418 sulfato (en adelante denominado G418, fabricado por Sigma) según el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 257891/90.

Entre los ejemplos de los medios para el cultivo de células animales se incluyen el medio RPMI1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), medio EX-CELL 302 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por GIBCO BRL), medio de hibridoma-SFM (fabricado por GIBCO BRL) y medios preparados mediante la adición de diversos aditivos, tales como suero de feto bovino (en adelante denominado FCS) a dichos medios. Mediante el cultivo en el medio del transformante obtenido, puede producirse el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado y acumularse en el sobrenadante del cultivo.

La cantidad y actividad de unión a antígeno del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado producido en el sobrenadante de cultivo puede medirse mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima [en adelante denominado ELISA; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, 1998; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] o similares.

La cantidad del anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado que debe producir el transformante puede incrementarse mediante la utilización de un sistema de amplificación de gen DHFR o similar según el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 257891/90.

El anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado puede purificarse a partir del sobrenadante del cultivo del transformante utilizando una columna de proteína A [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 8, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996].

Además, también pueden utilizarse métodos de purificación utilizados generalmente para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la purificación puede llevarse a cabo mediante combinaciones de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y similares.

El peso molecular de la cadena H, la cadena L o la molécula de anticuerpo completa del anticuerpo híbrido humano o anticuerpo humanizado purificado puede medirse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizado con SDS [en adelante denominado SDS-PAGE; Nature 227:680, 1970], transferencia western [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 12, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] y similares.

Anteriormente se ha mostrado el método para producir la composición de anticuerpos utilizando una célula animal como huésped. La composición de anticuerpos también puede producirse utilizando una levadura, una célula de insecto, una célula vegetal, un animal individual o una planta individual mediante métodos similares.

5 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el caso de que la célula anfitriona sea capaz de expresar la molécula de anticuerpo, puede producirse la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante la introducción de un gen codificante del anticuerpo en la célula anfitriona que expresa la molécula de anticuerpo, cultivar la célula y purificar la composición de anticuerpo deseada a partir del cultivo.

10 En el caso de que se utilice una levadura como célula anfitriona, puede utilizarse YEP13 (ATCC nº 37115), YEp24 (ATCC nº 37051), YCp50 (ATCC nº 37419) y similares como el vector de expresión.

Como promotor, pueden utilizarse cualesquiera promotores capaces de expresión en cepas de levadura. Entre los promotores adecuados se incluyen promotores de genes de la ruta glucolítica, tales como hexosacinasasa, promotor PHO5, promotor PGK, promotor GAP, promotor ADH, promotor gal 1, promotor gal 10, promotor de proteína de choque térmico, promotor MFα1 y promotor CUP 1.

15 Son ejemplos de células anfitrionas adecuadas, microorganismos pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon* y *Schwanniomyces* y específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius* y similares.

25 La introducción del vector recombinante puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos para introducir ADN en levaduras, por ejemplo la electroporación [Methods Enzymol. 194:182, 1990], el método del esferoplasto [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1929, 1978], el método del acetato de litio [J. Bacteriology 153:163, 1983] y el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978.

30 En el caso de que se utilice una célula animal como la célula anfitriona, como vector de expresión puede utilizarse pcDNA1, pcDM8 (disponible comercialmente de Funakoshi Co., Ltd.), pAGE107 [solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 22979/91; Cytotechnology 3:133, 1990], pAS3-3 [solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 22979/91; Cytotechnology 3:133, 1990], pAS3-3 (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 227075/90), pCDM8 [Nature 329:840, 1987], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen Corp.), pREP4 (fabricado por Invitrogen Corp.), pAGE103 [J. Biochemistry 101:1307, 1987], pAGE210 y similares.

35 Como promotor, pueden utilizarse cualesquiera promotores capaces de expresar en células animales. Entre los promotores adecuados se incluyen el promotor del gen IT (inmediato temprano) del citomegalovirus (CMV), el promotor temprano del SV40, el promotor de un retrovirus, el promotor metalotioneína, el promotor de choque térmico, el promotor SRα y similares. El intensificador del gen IT del CMV humano puede utilizarse en combinación con el promotor.

40 Son ejemplos de células anfitrionas adecuadas, las células Namalwa derivadas de seres humanos, células COS derivadas de mono, células CHO derivadas de hámster chino, HBT5637 (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 299/88), células de mieloma de rata, células de mieloma de ratón, células derivadas de riñón de hámster chino, células madre embrionarias, células de óvulo fecundado y similares.

45 En el caso de que se utilice una célula de insecto como la célula anfitriona, la proteína puede expresarse mediante los métodos descritos en Current Protocols in Molecular Biology; Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992; Bio/Technology 6:47, 1988, y similares.

50 Es decir, el vector de expresión y un baculovirus son cotransfectados en células de insecto con el fin de obtener un virus recombinante en el sobrenadante de cultivo de las células de insecto y después las células de insecto son infectadas con el virus recombinante, de manera que puede expresarse la proteína.

55 Entre los vectores que introducen genes que resultan útiles en dicho método se incluyen pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (productos de Invitrogen Corp.) y similares.

Un ejemplo del baculovirus es el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica*, que es un virus que infecta los insectos pertenecientes a la familia *Barathra*.

60 Son ejemplos de células de insecto las células ováricas Sf9 y Sf21 de *Spodoptera frugiperda* [Current Protocols in Molecular Biology; Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992] y la célula ovárica High 5 de *Trichoplusiani* (preparada por Invitrogen Corp.).

65 La cotransfección del vector de expresión anteriormente indicado y el baculovirus anteriormente indicado en células de insecto para la preparación del virus recombinante puede llevarse a cabo mediante el método del fosfato de calcio (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 227075/90), la lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84:7413, 1987] y similares.

En el caso de que se utilice una célula vegetal a modo de célula anfitriona, puede utilizarse el plásmido Ti, el vector virus del mosaico del tabaco y similares como vector de expresión.

Como promotor puede utilizarse cualquier promotor capaz de expresarse en células vegetales. Entre los promotores adecuados se incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor de la actina 1 del arroz y similares.

Son ejemplos de células anfitrionas adecuadas células vegetales tales como el tabaco, la patata, el tomate, la zanahoria, la soja, la colza, la alfalfa, el arroz, el trigo y la cebada.

La introducción del vector recombinante puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos de introducción de ADN en las células vegetales, por ejemplo el método que utiliza *Agrobacterium* (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 140885/84 y nº 70080/85, documento nº WO94/00977), la electroporación (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 251887/85) y el método que utiliza una pistola de partículas (pistola génica) (patentes japonesas nº 2606856 y nº 2517813).

La introducción del vector recombinante puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos para introducir ADN en células animales, por ejemplo la electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], el método del fosfato de calcio (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 227075/90), la lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987], el método de la inyección (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual), el método que utiliza una pistola de partículas (pistola génica) (patentes japonesas nº 2606856 y nº 2517813), el método de DEAE-dextrano [Biomaterial Series 4 - Methods of Gene Transfer, Expression and Analysis (Yodosha), editado por Takashi Yokota y Kenichi Arai, 1994] y el método del vector virus (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual).

La expresión del gen codificante del anticuerpo puede llevarse a cabo no sólo mediante expresión directa sino también mediante producción secretoria, expresión de una proteína de fusión de la región Fc y otra proteína y similares, según los métodos indicados en Molecular Cloning, segunda edición.

La composición de anticuerpo puede producirse mediante el cultivo del transformante obtenido tal como anteriormente en un medio, dejando que se produzcan y acumulen las moléculas de anticuerpo en el cultivo y recuperándolas a partir del mismo. El cultivo del transformante en un medio puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales de cultivo de la célula anfitriona.

Para el cultivo del transformante obtenido mediante la utilización de un eucariota, tal como una levadura, como huésped, puede utilizarse cualquiera de los medios naturales y los medios sintéticos en la medida de que sean medios adecuados para el cultivo eficiente del transformante que contengan fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y similares que puedan ser asimilados por el huésped utilizado.

Como fuentes de carbono puede utilizarse cualquier fuente de carbono que pueda ser asimilada por los microorganismos. Entre los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas se incluyen carbohidratos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que las contienen, almidón e hidrolizado de almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico, y alcoholes tales como etanol y propanol.

Como fuentes de nitrógeno puede utilizarse amonio, sales amónicas de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como cloruro amónico, sulfato amónico, acetato amónico y fosfato amónico, y otros compuestos que contiene nitrógeno, así como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licores del lavado del maíz, hidrolizado de caseína, torta de soja, hidrolizado de torta de soja y diversas células microbianas fermentadas y productos digeridos de los mismos.

Entre los ejemplos de sales inorgánicas se incluyen dihidrogenofosfato potásico, hdirogenofosfato dipotásico, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio y similares.

El cultivo se lleva a cabo habitualmente bajo condiciones aeróbicas, por ejemplo mediante agitación del cultivo o cultivo bajo centrifugación sumergido bajo aireación. La temperatura del cultivo preferentemente es de entre 15°C y 40°C, y el periodo de cultivo habitualmente es de entre 16 horas y 7 días. El pH se mantuvo entre 3,0 y 9,0 durante el cultivo. Se llevó a cabo el ajuste del pH mediante la utilización de un ácido orgánico o inorgánico, una solución de álcali, urea, carbonato de calcio, amonio y similares.

En caso necesario, pueden añadirse antibióticos tales como ampicilina y tetraciclina al medio durante el cultivo.

En el caso de que se cultive un microorganismo transformado con un vector recombinante utilizando un promotor inducible, puede añadirse un inductor al medio, en caso necesario. Por ejemplo, en el caso de un microorganismo

transformado con un vector recombinante utilizando el promotor *lac*, puede añadirse al medio isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o similares, y en el caso de un microorganismo transformado con un vector recombinante utilizando el promotor *trp*, puede añadirse ácido indolacrilico o similares.

- 5 El cultivo se lleva a cabo habitualmente bajo las condiciones siguientes: pH de entre 6,0 y 8,0 a una temperatura de entre 30°C y 40°C durante 1 a 7 días en presencia de 5% de CO₂.

En caso necesario, pueden añadirse al medio antibióticos tales como canamicina y penicilina durante el cultivo.

- 10 Para el cultivo del transformante obtenido mediante la utilización de una célula de insecto como huésped, como medio pueden utilizarse medios tales como el medio TNM-FH (fabricado por Pharmingen, Inc.), medio Sf-900 II SFM (fabricado por Life Technologies, Inc.), ExCell 400 y ExCell 405 (fabricado por JRH Biosciences, Inc.) y medio para insectos de Grace [Nature 195:788, 1962].

- 15 El cultivo se lleva a cabo habitualmente bajo las condiciones siguientes: pH de 6,0 a 7,0 a una temperatura de entre 25°C y 30°C durante 1 a 5 días.

En caso necesario pueden añadirse al medio durante el cultivo antibióticos tales como la gentamicina.

- 20 El transformante obtenido mediante la utilización de una célula vegetal como huésped puede cultivarse en forma de células como tales o tras la diferenciación de las mismas en células u órganos de la planta. Para el cultivo de dicho transformante, como medio pueden utilizarse medios utilizados generalmente, tales como medio de Murashige-Skoog (MS) y medio White, medios preparados mediante la adición de fitohormonas tales como auxina y citoquinina, y similares.

- 25 El cultivo se lleva a cabo habitualmente bajo condiciones de pH de 5,0 a 9,0 a una temperatura de entre 20°C y 40°C durante 3 a 60 días.

En caso necesario, pueden añadirse antibióticos tales como canamicina e higromicina al medio durante el cultivo.

- 30 Tal como se ha indicado anteriormente, la composición de anticuerpo puede producirse mediante el cultivo, según un método de cultivo convencional, del transformante derivado de una célula animal o de una célula vegetal y que porta un vector de expresión en el que se ha integrado ADN codificante de la molécula de anticuerpo, dejando que se forme y acumule la composición de anticuerpo y recuperando la composición de anticuerpo a partir del cultivo.

- 35 La expresión del gen codificante del anticuerpo puede llevarse a cabo no sólo mediante expresión directa sino también mediante producción secretoria, expresión de proteína de fusión y similares, siguiendo los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición.

- 40 La composición de anticuerpo puede producirse mediante expresión intracelular en las células anfitrionas, puede producirse mediante secreción extracelular a partir de las células anfitrionas o puede producirse sobre las membranas externas de las células anfitrionas. Puede adoptarse un método de producción deseable modificando el tipo de células anfitrionas utilizadas o la estructura de la molécula de anticuerpo que debe producirse.

- 45 En el caso de que la composición de anticuerpo se produzca en células anfitrionas o sobre las membranas externas de las células anfitrionas, resulta posible forzar que la composición de anticuerpo sea secretada al exterior de las células anfitrionas mediante la aplicación del método de Paulson et al. [J. Biol. Chem. 264:17619, 1989], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. UAS 86:8227, 1989; Genes Develop. 4:1288, 1990] o los métodos descritos en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 336963/93, documento nº WO94/23021, y similares.

- 50 Es decir, resulta posible forzar la secreción de la molécula de anticuerpo deseada al exterior de las células anfitrionas mediante la inserción de ADN codificante de la molécula de anticuerpo y ADN codificante de un péptido de señal adecuado para la expresión de la molécula de anticuerpo en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en las células anfitrionas y después expresando la molécula de anticuerpo mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante.

También resulta posible incrementar la cantidad de la composición de anticuerpo que debe producirse mediante la utilización de un sistema de amplificación génica utilizando un gen dihidrofolato reductasa o similar siguiendo el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 2277075/90.

- 60 Además, puede producirse la composición de anticuerpo utilizando un animal individual en el que se introduce un gen (animal transgénico no humano) o una planta individual en la que se introduce un gen (planta transgénica) construida mediante la rediferenciación de las células animales o vegetales en las que se introducen genes.

- 65 En el caso de que el transformante sea un animal individual o una planta individual, la composición de anticuerpo puede producirse criando o cultivando el animal o la planta de la manera habitual, dejando que se forme y acumule

en el mismo la composición de anticuerpo y recolectando la composición de anticuerpo a partir del animal individual o la planta individual.

La producción de la composición de anticuerpo utilizando un animal individual puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la producción de la composición de anticuerpo deseado en un animal construido mediante la introducción del gen siguiendo los métodos conocidos [American Journal of Clinical Nutrition 63:639S, 1996; American Journal of Clinical Nutrition 63:627S, 1996; Bio/Technology 9:830, 1991].

En el caso de un animal individual, puede producirse la composición de anticuerpo, por ejemplo, criando un animal transgénico no humano en el que se introduce ADN codificante de la molécula de anticuerpo, dejando que se forme y se acumule la composición de anticuerpo en el animal y recolectando la composición de anticuerpo a partir del mismo. Entre los sitios en los que se forma y se acumula la composición de anticuerpo se incluyen la leche (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 309192/88), los huevos o similares del animal.

Como promotor en dicho procedimiento, pueden utilizarse cualesquiera promotores capaces de expresarse en un animal. Entre los promotores preferentes se incluyen promotores específicos de células de la glándula mamaria, tales como el promotor α -caseína, promotor β -caseína, promotor β -lactoglobulina y promotor de proteína ácida del suero.

La producción de la composición de anticuerpo utilizando una planta individual puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el cultivo de una planta transgénica en la que se introduce ADN codificante de la molécula de anticuerpo siguiendo métodos conocidos [Soshiki Baiyo (Tissue Culture) 20, 1994; Soshiki Baiyo (Tissue Culture) 21, 1995; Trends in Biotechnology 15:45, 1997], dejando que se forme y se acumule la composición de anticuerpo en la planta y recolectando la composición de anticuerpo a partir de la misma.

En el caso de que la composición de variante de anticuerpo producida por el transformante en el que se introduce el gen codificante de la molécula de anticuerpo se produzca en una forma soluble en las células, se recuperan las células mediante centrifugación tras completarse el cultivo y se suspenden en un tampón acuoso, seguido de la fragmentación utilizando un sonicator, una prensa francesa, un homogeneizador Manton-Gaulin, un molino Dynomill o similar con el fin de obtener un extracto sin células.

Puede obtenerse una preparación purificada de la composición de anticuerpo mediante centrifugación del extracto sin células con el fin de obtener el sobrenadante y después someter al sobrenadante a medios ordinarios para aislar y purificar enzimas, por ejemplo la extracción con un solvente, la precipitación con una concentración saturante de sulfato amónico y similares, el desalado, la precipitación con un solvente orgánico, la cromatografía de intercambio aniónico utilizando resinas tales como dietilaminoetilo (DEAE)-sefaraosa y DIAION HPA-75 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), la cromatografía de intercambio catiónico utilizando resinas tales como S-Sepharose FF (fabricado por Pharmacia), la cromatografía hidrofóbica utilizando resinas tales como la butil-sefaraosa y la fenil-sefaraosa, la filtración en gel utilizando un tamiz molecular, la cromatografía de afinidad, el cromatoenfoco y la electroforesis, tal como el enfoque isoeléctrico, solo o en combinación.

Además, en el caso de que se expresa la composición de anticuerpo mediante la formación de un cuerpo de inclusión en las células, éstas se recuperan y fragmentan de manera similar, seguido de la centrifugación para recuperar el cuerpo de inclusión de la composición de anticuerpo en forma de una fracción precipitada. El cuerpo de inclusión recuperado de la composición de anticuerpo se solubiliza con un agente desnaturante de proteínas. La solución de anticuerpo solubilizada se diluye o se dializa, de manera que la composición de anticuerpo se renaturaliza para que presenta una estructura tridimensional normal. A continuación, puede obtenerse una preparación purificada de la composición de anticuerpo mediante los mismos métodos de aislamiento y purificación tal como se ha indicado anteriormente.

En el caso de que la composición de anticuerpo se secrete extracelularmente, la composición de anticuerpo o derivado del mismo puede recuperarse en el sobrenadante de cultivo. Es decir, el cultivo se trata mediante medios iguales a los indicados anteriormente, por ejemplo la centrifugación, con el fin de obtener un sobrenadante de cultivo. Puede obtenerse una preparación purificada de la composición de anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo mediante la utilización de métodos de aislamiento y purificación iguales a los indicados anteriormente.

La composición de variante de anticuerpo purificada de la presente invención es una composición que comprende únicamente moléculas de anticuerpo a las que no se encuentra unida ninguna cadena de azúcar, excepto por Asn en la posición 297 según el índice EU en la región Fc. Es decir, la composición de variante de anticuerpo purificada de la presente invención es una composición que únicamente comprende moléculas de variante de anticuerpo en las que la cadena de azúcar se une únicamente a Asn en la posición 297 según el índice EU en la región Fc.

Además, debido a que la composición de variante de anticuerpo de la presente invención tras la purificación es una composición de anticuerpo que comprende moléculas de anticuerpo uniformes a las que no se encuentran unidas cadenas de azúcar adicionales, excepto por Asn en la posición 297 según el índice EU en la región Fc, resulta más útil que la composición de anticuerpo que comprende moléculas de anticuerpo a las que se encuentran unidas

cadenas de azúcar adicionales.

2. Preparación de células productoras de composición de variante de anticuerpo de la presente invención

En la composición de variante de anticuerpo de la presente exposición, la composición de variante de anticuerpo que presenta una actividad ADCC elevada en la que las cadenas de azúcar unidas a Asn en otra posición diferente de la posición 297 se encuentran reducidas o eliminadas pueden prepararse mediante el control de la fucosa nuclear de la cadena de azúcar que se une a la Asn en la posición 279 en la región Fc del anticuerpo. Puede prepararse una célula en las que se controla la fucosa nuclear utilizando el método siguiente.

Específicamente, se selecciona una célula en la que un enzima relacionado con la modificación de la cadena de azúcar de una fucosa nuclear unida a la Asn en la posición 297 en la región Fc del anticuerpo, en el que el enzima incluye un enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa, un enzima relacionado con el transporte al aparato de Golgi, o un enzima relacionado con la unión de una fucosa nuclear. También puede obtenerse una célula mediante diversas técnicas artificiales indicadas posteriormente. Estas células obtenidas pueden utilizarse como células anfitrionas. Se indican posteriormente los detalles.

Específicamente, una célula en la que se controla una fucosa nuclear puede prepararse mediante un método para reducir o anular una actividad enzimática relacionada con la modificación de la cadena de azúcar de una fucosa nuclear, o un método para incrementar una actividad de un enzima de corte de fucosa nuclear.

Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de la cadena de azúcar de una fucosa nuclear se incluyen un enzima relacionado con la síntesis o transporte de GDP-L-fucosa y un enzima relacionado con la unión de una fucosa nuclear a una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo.

Entre los ejemplos específicos del enzima relacionado con la síntesis o el transporte de la GDP-L-fucosa se incluyen GDP-manosa 4,6-deshidratasa (en adelante denominado GMD), GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (en adelante denominado Fx), GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (en adelante denominada GFPP), fucocinasa, transportador de GDP-L-fucosa y similares.

Entre los ejemplos de enzimas relacionados con la unión de una fucosa nuclear a una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se incluyen la α 1,6-fucosiltransferasa (en adelante denominada FUT8), la α -L-fucosidasa y similares.

La célula para producir la composición de variante de anticuerpo de la presente invención incluye una célula en la que se ha reducido o eliminado una de las actividades enzimáticas anteriormente indicadas o una célula en la que se ha reducido o eliminado una pluralidad de las actividades enzimáticas anteriormente indicadas. Además, puede utilizarse una célula en la que la actividad enzimática relacionada con la modificación de una cadena de azúcar de una fucosa nuclear es originalmente baja para reducir adicionalmente o eliminar la actividad enzimática relacionada con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear.

(1) Técnica de interrupción génica con diana en un gen codificante de un enzima.

La célula anfitriona utilizada para preparar una célula que produce un anticuerpo con una actividad ADCC elevada (en adelante denominado anticuerpo con actividad ADCC elevada) puede prepararse interrumpiendo un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear.

El gen tal como se utiliza en la presente memoria incluye ADN y ARN.

El método de interrupción génica puede ser cualquier método capaz de interrumpir el gen codificante del enzima. Entre los métodos útiles se incluyen el método antisentido, el método de ribozima, el método de recombinación homóloga, el método de oligonucleótido de ARN-ADN (en adelante denominado método RDO), el método de interferencia de ARN (en adelante denominado método de ARNi), un método que utiliza un retrovirus y un método que utiliza un trasposón, y similares. Estos métodos se describen de manera específica posteriormente.

Entre los ejemplos de célula anfitriona para producir la composición de variante de anticuerpo de la presente invención se incluyen levaduras, una célula animal, una célula de insecto y una célula vegetal que presenta un gen de un enzima diana relacionado con una modificación de fucosa o que no presenta ningún gen del enzima relacionado con una modificación original de fucosa. Específicamente puede utilizarse cualquier célula anfitriona indicada en 1, anteriormente.

En el caso de que se utilice una célula vegetal como célula anfitriona, puede producirse una proteína con cadenas de azúcar de tipo humano mediante la reducción o eliminación de un gen codificante de un enzima relacionado con la unión de la α 1,3-fucosa y un gen codificante de un enzima relacionado con la unión de la β 1,2-xilosa.

(a) Preparación de la célula anfitriona para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante el método antisentido o el método de ribozima.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante el método de antisentido o el método de ribozima indicado en Cell Technology 12:239, 1993; Bio/Technology 17:1097, 1999; Hum. Mol. Genet. 5:1083, 1995; Cell Technology 13:255, 1994; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1886, 1999, y similares con diana en un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa de la manera siguiente.

Se prepara un ADNc o un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear. Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc o ADN genómico preparado. Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña un gen antisentido o un ribozima de la longitud apropiada que comprende una fracción de ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa, regiones no traducidas o intrones.

Con el fin de expresar el gen antisentido o ribozima en una célula, se prepara un vector recombinante mediante la inserción de un fragmento o la longitud completa del ADN preparado en un sitio cadena abajo de un promotor en un vector de expresión apropiado. Puede obtenerse un transformante mediante la introducción del vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede obtenerse mediante la selección de un transformante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa. La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención también puede obtenerse mediante la selección de un transformante utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular o la estructura de cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo producida.

Los vectores de expresión que pueden utilizarse son aquellos capaces de replicación autónoma o la integración en el cromosoma de las células anfitrionas anteriormente indicadas y que comprenden un promotor en una posición apropiada para la transcripción del gen antisentido o ribozima diseñado. Entre los ejemplos de los vectores de expresión se incluyen los indicados en 3, posteriormente.

La introducción de un gen en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en diversas células anfitrionas indicadas en 2, posteriormente.

La selección de un transformante utilizando, a modo de índice, la actividad de un enzima relacionado con la modificación de fucosa puede llevarse a cabo mediante los métodos siguientes.

Métodos para seleccionar un transformante

Puede seleccionarse una célula en la que se elimina la actividad de un enzima relacionado con la modificación de fucosa, mediante la medición de la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa utilizando métodos bioquímicos o técnicas de ingeniería genética descritas en Shin Seikagaku Jikken Koza (New Lectures on Experiments in Biochemistry) 3 - Saccharides I, Glycoprotein (Tokyo Kagaku Dojin), editado por The Japanese Biochemical Society, 1988; Cell Technology, Extra Edition, Experimental Protocol Series, Glycobiology Experimental Protocol, Glycoprotein, Glycolipid and Proteoglycan (Shujunsha), editado por Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Kiyoshi Furukawa and Kazuyuki Sugawara, 1996; Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

Un ejemplo de los métodos bioquímicos es un método en el que se evalúa la actividad enzimática utilizando un sustrato específico de enzima. Entre los ejemplos de las técnicas de ingeniería genética se incluyen el análisis de transferencia northern y la RT-PCR en la que se mide la cantidad de ARNm de un gen codificante del enzima.

La selección de un transformante utilizando la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular como índice puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el método indicado en 5, posteriormente. La selección de un transformante utilizando la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida a modo de índice puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, los métodos indicados en 5, posteriormente.

La preparación de un ADNc codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el método siguiente.

Método de preparación de ADNc

Se prepara ARN total o ARNm a partir de diversos tejidos o células de diversos anfitriones. Se prepara una biblioteca de ADNc a partir del ARN total o ARNm obtenido. Se preparan cebadores degenerados basándose en la

secuencia de aminoácidos de un enzima relacionado con la modificación de fucosa. Se obtiene un fragmento génico codificante del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear mediante PCR utilizando la biblioteca de ADNc preparada como molde.

5 Puede obtenerse un ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa mediante el cribado de la biblioteca de ADNc utilizando el fragmento génico obtenido como sonda. Como ARNm de un tejido o célula animal humano o no humano, puede utilizarse uno disponible comercialmente (por ejemplo el preparado por Clontech), o puede prepararse a partir de tejido o células de un animal humano o no humano de la manera siguiente.

10 Entre los métodos de preparación de ARN total a partir de un tejido o célula de animal humano o animal se incluyen el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology 154:3, 1987], el método de tiocianato de guanidina ácido-fenol-cloroformo (AGPC) [Analytical Biochemistry 162:156, 1987; Experimental Medicine 9:1937, 1991], y similares.

15 Entre los métodos para preparar ARNm como ARN poli(A)⁺ a partir del ARN total se incluyen el método de columna de celulosa con oligo (dT) inmovilizado (Molecular Cloning, segunda edición).

También resulta posible preparar ARNm mediante la utilización de un kit disponible comercialmente, tal como el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) o el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

Se prepara una biblioteca de ADNc a partir del ARNm obtenido de un tejido o célula animal humano o no animal. Entre los métodos para preparar la biblioteca de ADNc se incluyen los métodos descritos en Molecular Cloning, segunda edición; Current Protocols in Molecular Biology; A Laboratory Manual, 2a ed., 1989, y similares.

25 Un kit disponible comercialmente incluye métodos que utilizan el sistema plásmido SuperScript para la síntesis de ADNc y el kit Plasmid Cloning (fabricado por Life Technologies) y el kit de síntesis ZAP-ADNc (fabricado por Stratagene) y similares.

30 Como vector de clonación para preparar la biblioteca de ADNc, pueden utilizarse cualesquiera vectores, por ejemplo vectores fagos y vectores plásmido, con la condición de que sean de replicación autónoma en *Escherichia coli* K12.

Entre los ejemplos de vectores adecuados se incluyen ZAP Express [fabricado por Stratagene; Strategies 5:58, 1992], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research 17:9494, 1989], λZAP II (fabricado por Stratagene), λgt10, λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach 1, 49, 1985], λTriplEx (fabricado por Clontech), λExCell (fabricado por Pharmacia), pT7T318U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983], pUC18 [Gene 33:103, 1985] y similares.

40 Puede utilizarse cualquier microorganismo como microorganismo huésped para preparar la biblioteca de ADNc, aunque preferentemente se utiliza *Escherichia coli*. Son ejemplos de microorganismos huéspedes adecuados, *Escherichia coli* XL1-Blue MRF [preparado por Stratagene; Strategies 5:81, 1992], *Escherichia coli* C600 [Genetics, 39:440, 1954], *Escherichia coli* Y1088 [Science 222:778, 1983], *Escherichia coli* Y1090 [Science 222:778, 1983], *Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol. 166:1, 1983], *Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol. 16:118, 1966], *Escherichia coli* JM105 [Gene 38:275, 1985], y similares.

45 Puede utilizarse la biblioteca de ADNc sin modificación en el análisis siguiente. Alternativamente, con el fin de obtener eficientemente ADNc de longitud completa mediante la reducción de la proporción de ADNc parciales, puede utilizarse en el análisis a continuación una biblioteca de ADNc preparada utilizando el método de adición de oligo terminal ("oligo-capping") desarrollado por Sugano et al. [Gene 138:171, 1994; Gene 200:149, 1997; Protein, Nucleic Acid and Enzyme 41:603, 1996; Experimental Medicine 11:2491, 1993; cDNA Cloning (Yodosha), 1996; Methods for Preparing Gene Libraries (Yodosha), 1994].

Se preparan cebadores degenerados específicos para las secuencias de nucleótidos 5'-terminales y 3'-terminales basándose en una secuencia de nucleótidos que se presume que codifica la secuencia de aminoácidos de un enzima relacionado con la modificación de fucosa. A continuación, se obtienen los fragmentos génicos codificantes del enzima relacionado con la modificación de fucosa mediante la amplificación del ADN mediante el método de PCR [PRT Protocols, Academic Press, 1990] utilizando las bibliotecas y cebadores de ADNc preparados.

60 Puede confirmarse que el fragmento génico obtenido es un ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos mediante métodos de análisis de la secuencia de nucleótidos utilizados generalmente, tales como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463, 1977] o mediante la utilización de analizadores de la secuencia de nucleótidos, tales como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

65 Un ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede obtenerse a partir del ADNc o biblioteca de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en un tejido o célula humano o animal no humano

mediante hibridación de colonias o hibridación de placas (Molecular Cloning, segunda edición9 utilizando el fragmento génico anteriormente indicado a modo de sonda.

También puede obtenerse un ADNc codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa, mediante
amplificación por PCR utilizando el ADNc o la biblioteca de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en un
tejido o célula humano o de animal no humano como molde y utilizando los cebadores utilizados para obtener el
fragmento génico codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa.

La secuencia de nucleótidos del ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede
determinarse mediante métodos de análisis de la secuencia de nucleótidos utilizados generalmente, tales como el
método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463, 1977] o mediante la utilización de
analizadores de la secuencia de nucleótidos, tales como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por
Applied Biosystems).

Mediante la búsqueda en bases de datos de secuencia de nucleótidos tales como GenBank, EMBL o DDBJ
utilizando un programa de búsqueda de homologías, tal como BLAST, basado en la secuencia de nucleótidos
determinada del ADNc, puede confirmarse que el ADN obtenido es un gen codificante del enzima relacionado con la
modificación de fucosa de entre los genes en la base de datos de secuencias de nucleótidos.

Entre los ejemplos de secuencias de nucleótidos de los genes codificantes del enzima relacionado con la síntesis de
la GDP-L-fucosa obtenida mediante los métodos anteriormente indicados se incluyen la secuencia de nucleótidos de
GMD y la secuencia de nucleótidos de Fx dada a conocer en el documento nº WO2005/035741.

Entre los ejemplos de secuencias de nucleótidos de los genes codificantes del enzima relacionado con la
modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo
complejo obtenida mediante los métodos anteriormente indicados se incluye la secuencia de nucleótidos de FUT8
dada a conocer en la patente US nº 7.393.683.

Entre los ejemplos de secuencias de nucleótidos de los genes codificantes del enzima relacionado con el transporte
de la GDP-L-fucosa al aparato de Golgi obtenido mediante los métodos anteriormente indicados se incluye la
secuencia de nucleótidos del transportador de GDP-L-fucosa dado a conocer en la solicitud publicada de patente US
nº 2004/0110282.

El ADNc codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa también puede obtenerse mediante
síntesis química con un sintetizador de ADN, tal como el sintetizador de ADN modelo 392 (fabricado por Perkin
Elmer) utilizando el método de fosfoamidita basado en la secuencia de nucleótidos determinada del ADN deseado.

La preparación de un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede
llevarse a cabo mediante el método siguiente.

Método para preparar ADN genómico

El ADN genómico puede prepararse mediante métodos conocidos descritos en Molecular Cloning, segunda edición,
Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

Además, el ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una
fucosa nuclear también puede obtenerse mediante la utilización de un kit tal como el sistema de cribado de
bibliotecas de ADN genómico (fabricado por Genome Systems) o los kits Universal GenomeWalker™ (fabricados por
Clontech).

La secuencia de nucleótidos del ADN codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede
determinarse mediante los métodos de análisis de nucleótidos utilizados generalmente, tales como el método
dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463, 1977] o mediante la utilización de analizadores de la
secuencia de nucleótidos tales como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

Mediante la búsqueda en bases de datos de secuencias de nucleótidos tales como GenBank, EMBL o DDBJ
utilizando un programa de búsqueda de homologías tal como BLAST basándose en la secuencia de nucleótidos
determinada del ADN genómico, puede confirmarse que el ADN obtenido es un gen codificante del enzima
relacionado con la modificación de fucosa entre los genes en la base de datos de secuencias de nucleótidos.

El ADN genómico codificante del enzima relacionado con el enzima relacionado con la modificación de cadena de
azúcar de una fucosa nuclear también puede obtenerse mediante síntesis química con un sintetizador de ADN tal
como el sintetizador de ADN modelo 392 (fabricado por Perkin Elmer) utilizando el método de fosforamidita basado
en la secuencia de nucleótidos determinada del ADN.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención

también puede obtenerse sin utilizar un vector de expresión, mediante la introducción directa en una célula anfitriona de un oligonucleótido antisentido o ribozima diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. El oligonucleótido antisentido o ribozima puede prepararse mediante métodos conocidos o mediante la utilización de un sintetizador de ADN.

Específicamente, basándose en la información de secuencia en un oligonucleótido con una secuencia correspondiente a preferentemente 5 a 150, más preferentemente 5 a 60, todavía más preferentemente 10 a 40 nucleótidos contiguos en la secuencia de nucleótidos del ADNc y del ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa, puede sintetizarse un oligonucleótido correspondiente a la secuencia complementaria al oligonucleótido anteriormente indicado (oligonucleótido antisentido) o un ribozima que comprende la secuencia de oligonucleótidos.

El oligonucleótido incluye oligoARN y derivados del oligonucleótido (en adelante denominados derivados de oligonucleótido).

Entre los derivados de oligonucleótido se incluye un derivado de oligonucleótido en el que el enlace fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace fosforotioato, un derivado oligonucleótido en el que el enlace fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace fosfoamidato N3'-P5', un derivado oligonucleótido en el que el enlace ribosa-fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace ácido péptido-nucleico, un derivado oligonucleótido en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye por C-5 propinil-uracilo, un derivado oligonucleótido en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye por C-5 tiazolil-uracilo, un derivado oligonucleótido en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye por C-5 propinilcitosina, un derivado oligonucleótido en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye por citosina modificada con fenoxazina, un derivado oligonucleótido en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye por 2'-O-propilribosa, y un derivado oligonucleótido en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye por 2'-metoxietoxiribosa [Saibou Kogaku (Cell Technology) 16:1463, 1997].

(b) Preparación de la célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante el método de recombinación homóloga.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante modificación de un gen diana en el cromosoma mediante el método de recombinación homóloga con diana en un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa.

La modificación del gen diana en el cromosoma puede llevarse a cabo mediante la utilización de los métodos descritos en *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (en adelante denominado "*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*"; *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, 1993; *Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*, Yodosha, 1995 (en adelante denominado *Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*), y similares, por ejemplo, de la manera siguiente.

Se prepara un ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADN genómico, se prepara un vector diana para la recombinación homóloga de un gen diana que debe modificarse (por ejemplo el gen estructural o el gen promotor para el enzima relacionado con la modificación de fucosa de una fucosa nuclear).

La célula anfitriona utilizada para la producción de la célula productora de anticuerpo de elevada actividad ADCC puede prepararse mediante la introducción del vector diana preparado en una célula anfitriona y seleccionando una célula en la que se ha producido la recombinación homóloga entre el gen diana en el cromosoma y el vector diana.

Como célula anfitriona, puede utilizarse cualquier levadura, células animales, células de insecto, células vegetales o similares, con la condición de que presenten un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Entre los ejemplos de células anfitrionas se incluyen los indicados en 2, posteriormente.

El ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear puede prepararse mediante los métodos de preparación de un ADN genómico indicados en 1 (1) (a), anteriormente.

El vector diana para la utilización en la recombinación homóloga del gen diana en el cromosoma puede prepararse siguiendo los métodos descritos en *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press, 1993; *Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*, Yodosha, 1995, y similares.

El vector diana puede ser de tipo sustitución o de tipo inserción.

La introducción del vector diana en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en las diversas células anfitrionas indicadas en 3, posteriormente.

Entre los métodos para seleccionar eficientemente un recombinante homólogo se incluyen la selección positiva, la selección de promotor, la selección negativa y la selección de poliA, descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, 1993; Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha, 1995, y similares.

Entre los métodos para seleccionar el recombinante homólogo deseado a partir de las líneas celulares seleccionadas se incluyen la hibridación southern (Molecular Cloning, segunda edición) y el método de PCR [PCR Protocols, Academic Press, 1990] para el ADN genómico.

(c) Preparación de la célula anfitriona utilizada para la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante el método RDO.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante el método RDO con diana en un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa, de la manera siguiente.

Se prepara un ADNc o un ADN genómico codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa mediante los métodos indicados en 1 (a), anteriormente. Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc o ADN genómico preparado. Basándose en la secuencia de ADN determinada, se diseña y se sintetiza un constructo de RDO de longitud apropiada que comprende una parte codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa, una parte de la región no traducida de la misma o una parte de intrones.

La célula anfitriona puede obtenerse mediante la introducción del RDO sintetizado en una célula anfitriona, seleccionando después un transformante en el que se ha producido una mutación en el enzima diana, es decir, el enzima relacionado con la modificación de fucosa.

Como célula anfitriona, puede utilizarse cualquier levadura, célula animal, célula de insecto, célula vegetal o similar con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Entre los ejemplos de células anfitrionas se incluyen los indicados en 3, posteriormente.

La introducción de la RDO en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en diversas células anfitrionas indicadas en 3, posteriormente.

El ADNc codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede prepararse mediante los métodos de preparación de un ADNc indicado en 1 (a), anteriormente, o similar.

El ADN genómico codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa puede prepararse mediante los métodos de preparación de un ADN genómico indicados en 1 (a), anteriormente, o similar.

Tras cortar el ADN con enzimas de restricción apropiados, la secuencia de nucleótidos del ADN puede determinarse mediante subclonación de los fragmentos de ADN en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), sometiendo los clones a la reacción generalmente utilizada como método de análisis de la secuencia de nucleótidos, tal como el método dideoxi de Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977] o similares, analizando después los clones mediante la utilización de un analizador automático de secuencias de nucleótidos tal como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems) o similar.

La RDO puede prepararse mediante métodos convencionales o mediante la utilización de un sintetizador de ADN.

Entre los métodos para seleccionar una célula en la que se ha producido una mutación mediante la introducción de la RDO en la célula anfitriona, en el gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa se incluyen los métodos para detectar directamente mutaciones en genes cromosómicos descritos en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

Para la selección del transformante, también pueden utilizarse los métodos siguientes: un método que utiliza, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa indicada anteriormente; un método que utiliza, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular tal como se ha indicado anteriormente, y un método que utiliza, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producido que se indica posteriormente.

El constructo de RDO puede diseñarse según las descripciones en Science 273:1386, 1996; Nature Medicine 4:285, 1998; Hepatology 25:1462, 1997; Gene Therapy 5:1960, 1999; Gene Therapy 5:1960, 1999; J. Mol. Med. 75:829, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8774, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768, 1999; Nuc. Acids Res. 27:1323, 1999; Invest. Dermatol. 111:1172, 1998; Nature Biotech. 16:1343, 1998; Nature Biotech. 18:43, 2000; Nature Biotech. 18:555, 2000, y similares.

(d) Preparación de la célula anfitriona para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante el método de ARNi.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante el método de ARNi con diana en el gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa de la manera siguiente.

Un ADNc codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa se prepara mediante los métodos indicados en 1, anteriormente. Se determina la secuencia de nucleótidos del ADNc preparado. Basándose en la secuencia de ADNc determinada, se diseña un gen ARNi de longitud apropiado que comprende una parte codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa o una parte de regiones no traducidas.

Con el fin de expresar el gen ARNi en una célula, se prepara un vector recombinante mediante la inserción de un fragmento o la longitud completa del ADNc preparado en un sitio cadena abajo de un promotor en un vector de expresión apropiado.

El vector recombinante se introduce en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión con el fin de obtener un transformante.

La célula anfitriona utilizada para la preparación de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede obtenerse mediante la selección de un transformante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa, o la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o una glucoproteína sobre la membrana celular.

Como célula anfitriona, puede utilizarse cualquier levadura, células animales, células de insecto, células vegetales o similares, con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Entre los ejemplos de células anfitrionas se incluyen los indicados en 3, posteriormente.

Los vectores de expresión que pueden utilizarse son aquellos capaces de replicación autónoma o la integración en el cromosoma en las células anfitrionas anteriormente indicadas y que comprende un promotor en una posición apropiada para la transcripción del gen ARNi diseñado. Entre los ejemplos de vectores de expresión se incluyen los indicados en 3, posteriormente.

La introducción de un gen en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en diversas células anfitrionas indicadas en 3, posteriormente.

Entre los métodos para seleccionar el transformante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa se incluyen los métodos indicados en 1, anteriormente.

Entre los métodos para seleccionar el transformante utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de glucoproteína producida sobre la membrana celular se incluyen el método indicado en 1 (a), posteriormente. Entre los métodos para seleccionar el transformante utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se incluyen los métodos indicados en 5, posteriormente.

Entre los métodos para preparar el ADNc codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa se incluyen los métodos para preparar un ADNc indicado en 1 (a), anteriormente, y similares.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención también puede obtenerse, sin utilizar un vector de expresión, mediante la introducción directa en una célula anfitriona del gen ARNi diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa.

El gen ARNi puede prepararse mediante métodos conocidos o mediante la utilización de un sintetizador de ADN. El constructo de gen ARNi puede diseñarse según las descripciones en Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000), y similares.

(e) Preparación de la célula anfitriona para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención mediante el método que utiliza un trasposón.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante la utilización del sistema de trasposón descrito en Nature Genet. 25:35, 2000, y similares, seleccionando después un mutante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa, o la estructura de cadena de azúcar de una molécula de glucoproteína producida o una glucoproteína sobre la membrana celular.

El sistema de trasposón es un sistema para inducir una mutación mediante inserción aleatoria de un gen exógeno en el cromosoma. En el sistema, un gen exógeno insertado en un trasposón habitualmente se utiliza como vector para inducir una mutación y se introduce en la célula simultáneamente un vector de expresión de trasposasa para la inserción aleatoria del gen en el cromosoma.

Puede utilizarse cualquier trasposasa con la condición de que resulte adecuada para la secuencia del trasposón que debe utilizarse.

Como gen exógeno, puede utilizarse cualquier gen con la condición de que pueda inducir una mutación en el ADN de una célula anfitriona.

Como célula anfitriona, puede utilizarse cualquier levadura, células animales, células de insecto, células vegetales o similares, con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Entre los ejemplos de células anfitrionas se incluyen las indicadas en 1, anteriormente. La introducción del gen en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en las diversas células anfitrionas indicadas en 2, posteriormente.

Entre los métodos para seleccionar el mutante que utilizan, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la modificación de fucosa se incluyen los métodos indicados en 2, posteriormente.

Entre los métodos para seleccionar el mutante que utilizan, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen el método indicado en 1 (a). Entre los métodos de selección del mutante que utilizan, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de glucoproteína producida se incluyen los métodos indicados en 5, posteriormente.

(2) Técnica de introducción de un mutante dominante negativo de un gen codificante de un enzima.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante la utilización de la técnica de introducción de un mutante dominante negativo de un gen diana, es decir, un gen codificante de un enzima relacionado con la modificación de fucosa.

Entre los ejemplos de enzimas relacionados con la síntesis de GDP-L-fucosa se incluyen GMD y Fx.

Entre los ejemplos de enzimas relacionados con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo terminal reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se incluyen la α 1,6-fucosiltransferasa.

Entre los ejemplos de la proteína relacionada con el transporte de la GDP-L-fucosa al aparato de Golgi se incluyen el transportador de la GDP-L-fucosa.

Dichos enzimas o proteínas presentan especificidad de sustrato y catalizan reacciones específicas. Mediante la interrupción del centro activo de dichos enzimas o proteínas con especificidad de sustrato y actividad catalítica, pueden prepararse los mutantes dominantes negativos de los mismos.

La preparación de un mutante dominante negativo se describe en detalle posteriormente, utilizando GMD como ejemplo de enzima diana.

Como resultado del análisis de la estructura tridimensional de GMD derivado de *Escherichia coli*, se ha encontrado que cuatro aminoácidos (Thr en la posición 133, Glu en la posición 135, Tyr en la posición 157 y Lys en la posición 161) presentan una función importante para la actividad enzimática (Structure 8:2, 2000).

Es decir, los mutantes preparados mediante la sustitución de los cuatro aminoácidos anteriormente indicados por otros aminoácidos basándose en la información de la estructura tridimensional mostraron todos una actividad enzimática significativamente reducida.

Por otra parte, se observaron pocos cambios en la capacidad de los mutantes de unirse al GMD coenzima NADP o al sustrato GDP-manosa. De acuerdo con lo anterior, puede prepararse un mutante dominante negativo mediante la sustitución de los cuatro aminoácidos que son responsables de la actividad enzimática de GMD.

Basándose en el resultado de la preparación de un mutante dominante negativo de GMD derivado de *Escherichia coli*, pueden prepararse mutantes dominantes negativos mediante la realización de una comparación de la homología y la predicción de la estructura tridimensional utilizando la información de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de GMD derivado de una célula CHO, puede prepararse un mutante dominante negativo mediante la sustitución de Thr en la posición 155, Glu en la posición 157, Tyr en la posición 179 y Lys en la posición 183 por otros aminoácidos.

La preparación de dicho gen portador de sustituciones de aminoácidos puede llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida a sitio, descrita en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

La célula anfitriona utilizada para la producción de la célula productora de anticuerpo de elevada actividad ADCC siguiendo el método de introducción génica descrito en Molecular Cloning, segunda edición, Current Protocols in Molecular Biology, Manipulating the Mouse Embryo, segunda edición, y similares, utilizando un gen codificante de un mutante dominante negativo de un enzima diana (en adelante abreviado como gen mutante dominante-negativo) preparado tal como anteriormente, por ejemplo de la manera siguiente.

Se preparó un gen mutante dominante negativo codificante del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo terminal reductor de una cadena de azúcar de enlace N-glucósido de tipo complejo o el enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa.

Basándose en el ADN de longitud completa del gen mutante dominante negativo preparado, se preparó según necesidad un fragmento de ADN de la longitud apropiada que contenía una región codificante de la proteína.

Se preparó un vector recombinante mediante inserción del fragmento de ADN o ADN de longitud completa en un sitio cadena abajo de un promotor en un vector de expresión apropiado. Se introdujo el vector recombinante en una célula anfitriona adecuada para el vector de expresión con el fin de obtener un transformante.

La célula anfitriona utilizada para la preparación de la célula productora de anticuerpo de actividad ADCC elevada puede obtenerse mediante la selección de un transformante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa, la actividad del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo, o la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o una glucoproteína sobre la membrana celular.

Como célula anfitriona, puede utilizarse cualquier levadura, célula animal, célula de insecto, célula vegetal o similar con la condición de que presente un gen codificante del enzima relacionado con la modificación de fucosa. Entre los ejemplos de células anfitrionas se incluyen los indicados en 1, anteriormente.

Los vectores de expresión que pueden utilizarse son aquellos capaces de replicación autónoma o integración en el cromosoma en las células anfitrionas anteriormente indicadas y que comprenden un promotor en una posición apropiada para la transcripción del ADN codificante del mutante dominante-negativo deseado. Entre los ejemplos de vectores de expresión se incluyen los indicados en 1, anteriormente.

La introducción de un gen en diversas células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante métodos adecuados para la introducción de un vector recombinante en diversas células anfitrionas indicadas en 1, anteriormente.

Entre los métodos para la selección del transformante utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la síntesis de un azúcar-nucleótido intracelular, GDP-L-fucosa, o la actividad del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se incluyen los métodos descritos en 2 (1) (a), posteriormente.

Entre los métodos para la selección del transformante utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular se incluyen el método descrito en 2 (5), posteriormente. Entre los métodos para la selección del transformante utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producido se incluyen los métodos descritos en 4 o 5, posteriormente.

(3) Técnica de introducción de una mutación en un enzima

La célula anfitriona utilizada para la preparación de la célula productora de anticuerpo de actividad ADCC elevada puede prepararse mediante la introducción de una mutación en un gen codificante del enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa o el enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo, seleccionando después una línea celular deseada en la que se ha producido la mutación en el enzima.

Entre los ejemplos de los enzimas relacionados con la síntesis de GDP-L-fucosa se incluyen GMD, Fx y similares.

Entre los ejemplos de enzimas relacionados con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se incluyen la α 1,6-fucosiltransferasa, la α -L-fucosidasa y similares.

Entre los métodos para introducir una mutación en el enzima se incluyen: 1) un método en el que se selecciona una línea celular deseada de entre mutantes obtenidos al someter una línea celular parental al tratamiento de

mutagénesis o mediante mutación espontánea utilizando, a modo de índice, la actividad del enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa o la actividad del enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo, 2) un método en el que se selecciona una línea celular deseada de entre los mutantes obtenidos al someter una línea celular prenatal al tratamiento de mutagénesis o mediante mutación espontánea utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida, y 3) un método en el que se selecciona una línea celular deseada de entre los mutantes obtenidos al someter una línea celular parental al tratamiento de mutagénesis o mediante mutación espontánea utilizando, a modo de índice, la estructura de cadena de azúcar de una glucoproteína sobre la membrana celular.

La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante cualquier método capaz de inducir una mutación puntual, una mutación por delección o una mutación por desplazamiento de marco en el ADN de una línea celular parental. Entre los métodos adecuados se incluyen el tratamiento con etil-nitrosourea, nitrosoguanidina, benzopireno o un pigmento acridina y la irradiación. También resultan útiles como mutágenos diversos agentes alquilantes y carcinógenos.

Se deja que un mutágeno actúa sobre una célula mediante los métodos descritos en Soshiki Baiyo no Gijutsu (Tissue Culture Techniques), tercera edición (Asakura Shoten), editado por The Japanese Tissue Culture Association, 1996; Nature Genet. 24:314, 2000, y similares.

Entre los ejemplos de los mutantes generados mediante mutación espontánea se incluyen mutantes espontáneos obtenidos continuando el subcultivo bajo las condiciones habituales de cultivo celular sin ningún tratamiento particular de mutagénesis.

(4) Técnica de supresión de la transcripción o traducción de un gen codificante de un enzima

La célula anfitriona utilizada para la preparación de la célula productora de anticuerpo de actividad ADCC elevada puede prepararse mediante supresión de la transcripción o traducción de un gen diana, es decir, un gen diana codificante de un enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa o un enzima relacionado con la modificación de cadena de azúcar de una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo utilizando la técnica de ARN/ADN antisentido [Bioscience and Industry 50:322, 1992; Chemistry 46:681, 1991; Biotechnology 9:358, 1992; Trends in Biotechnology 10:87, 1992; Trends in Biotechnology 10:152, 1992; Cell Technology 16:1463, 1997], la técnica de la triple hélice [Trends in Biotechnology 10:132, 1992], y similares.

(5) Técnica de selección de una línea celular resistente a una lectina que reconoce una fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido

La célula anfitriona utilizada para la preparación de la célula productora de anticuerpo de actividad ADCC elevada puede prepararse mediante la selección de una línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina mediante un enlace α en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido.

La selección de la línea celular resistente a la lectina que reconoce la fucosa nuclear en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el método que utiliza una lectina, descrito en Somatic Cell Mol. Genet. 12:51, 1986, y similares.

Como lectina, puede utilizarse cualquier lectina con la condición de que reconozca la estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en una cadena de azúcar unida a N-glucósido.

Entre los ejemplos específicos se incluyen la lectina LCA de lenteja (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), PSA de lectina de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), VFA de lectina de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*) y AAL de lectina de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*).

Específicamente, se cultivaron células en un medio que contenía la lectina anteriormente indicada a una concentración de entre 1 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml durante un periodo de entre un día y dos semanas, preferentemente de entre un día y una semana, subcultivando las células supervivientes o recolectando una colonia y transfiriéndola a un recipiente de cultivo. Mediante la continuación del cultivo utilizando medio que contenía la lectina, pudo seleccionarse la línea celular resistente a la lectina que reconoce la estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante un enlace α en una cadena de azúcar unida a N-glucósido.

3. Evaluación de la actividad de la composición de anticuerpo

La cantidad de proteína, la actividad de unión a FcR, la actividad de unión a C1q, la actividad de unión a antígeno o la actividad citotóxica, tal como la actividad ADCC y la actividad CDC, de la composición de variante de anticuerpo

purificada pueden medirse utilizando métodos conocidos, descritos en Monoclonal Antibodies, Antibody Engineering, o similares.

Específicamente, en el caso de que la composición de anticuerpo es un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo humanizado, la actividad de unión a un antígeno o la actividad de unión la línea celular cultivada que es positiva para antígeno puede medirse mediante ELISA, mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes [Cancer Immunol. Immunother. 36:373, 1993] y similares.

La actividad citotóxica para una línea celular en cultivo que es positiva par antígeno puede evaluarse mediante la medición de la actividad CDC, la actividad ADCC o similar [Cancer Immunol. Immunother. 36:373, 1993; solicitud publicada de patente US nº 2004/0259150].

La actividad de unión a FcR de la composición variante de anticuerpo de la presente invención puede confirmarse mediante la producción de una proteína FcγRIIIA recombinante o un receptor de Fc neonatal recombinante (FcRn), midiendo después una actividad de unión (solicitud publicada de patente US nº 2004/0259150).

El método para la medición de la actividad ADCC incluye un método en le que una célula diana marcada con un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, un pigmento o similar se deja en contacto con un anticuerpo y una célula efectora y después se mide la actividad de la sustancia marcada liberada por la célula diana dañada; un método en el que se deja que una célula diana entre en contacto con un anticuerpo y una célula efectora y después se mide la actividad biológica de un enzima liberado por la célula diana dañada, y similares.

El método para medir la actividad CDC incluye un método en el que una célula diana marcada con un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, un pigmento o similar se deja que entre en contacto con un anticuerpo y un espécimen biológico, tal como suero que contiene un componente del complemento y después se mide la actividad de la sustancia marcada liberada por la célula diana dañada; un método en el que se deja que una célula diana entre en contacto con un anticuerpo y un espécimen biológico, tal como suero, que contiene un componente del complemento, y después se mide la actividad biológica de un enzima liberado por la célula diana dañada, y similares.

La actividad de unión a FcγR, la actividad ADCC y/o la actividad CDC de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención en la que una cadena de azúcar no deseable no se encuentra unida a residuos de aminoácidos diferentes de Asn en la posición 297 por la sustitución de aminoácido, es igual o superior a la del anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido.

Es decir, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención presenta una actividad de unión a FcγR, una actividad ADCC y/o una actividad CDC igual o superior a la del anticuerpo con la región Fc original aunque el residuo de aminoácido de la composición de variante de anticuerpo se haya sustituido en secuencias de aminoácidos diferentes de Asn en la posición 297 a una cadena de azúcar unida a N-glucósido se encuentra unida en la región Fc.

Además, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención presenta una actividad CDC más elevada que la IgG1 humana y la IgG3 humana y presenta una actividad ADCC y/o actividad CDC sustancialmente igual o superior que un anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido.

Además, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención que presenta una región constante que comprende la secuencia de aminoácido representada por SEC ID nº 3 presenta una actividad CDC superior que la IgG1 humana y la IgG3 humana y presenta una actividad ADCC y/o una actividad CDC sustancialmente igual o superior que la del anticuerpo antes de llevar a cabo la sustitución de aminoácido.

La seguridad y efecto terapéutico de la composición de anticuerpo en el ser humano puede evaluarse utilizando un modelo animal apropiado de una especie relativamente próxima al ser humano, por ejemplo el mono Cynomolgus.

4. Análisis de cadenas de azúcar en la composición de anticuerpo

La estructura de cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo expresada en diversas células puede analizarse siguiendo los métodos generales de análisis de la estructura de cadena de azúcar de la glucoproteína. Por ejemplo, una cadena de azúcar unida a una molécula de IgG consiste de azúcares neutros, tales como galactosa (Gal), manosa (Man) y fucosa (Fuc), aminoazúcares tales como N-acetilglucosamina (GlcNAc) y azúcares ácidos tales como ácido siálico (Sial) y pueden analizarse mediante técnicas tales como el análisis de la composición de azúcares y el análisis de la estructura de la cadena de azúcar utilizando el mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar.

(1) Análisis de composiciones de azúcares neutros y de aminoazúcares

La composición de cadenas de azúcar de una composición de anticuerpo puede analizarse llevando a cabo la

hidrólisis ácida de las cadenas de azúcar con ácido trifluoroacético o similar con el fin de liberar los azúcares neutros o los aminoazúcares y analizar la proporción composicional.

Específicamente, el análisis puede llevarse a cabo mediante un método que utiliza un dispositivo de análisis de carbohidratos fabricado por Dionex. BioLC es un dispositivo para el análisis de la composición de azúcares mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento-detección amperométrica pulsada) [J. Liq. Chromatogr. 6:1577, 1983].

La proporción composicional también puede analizarse mediante el método de marcaje de fluorescencia utilizando 2-aminopiridina. Específicamente, la proporción composicional puede calcularse mediante el marcaje fluorescente de una muestra hidrolizada con ácido mediante 2-aminopiridilación según un método conocido [Agric. Biol. Chem. 55(1):283-284, 1991], seguido del análisis de la composición mediante HPLC.

(2) Análisis de las estructuras de cadena de azúcar

Las estructuras de cadena de azúcar de una composición de anticuerpo pueden analizarse mediante el mapeado bidimensional de cadenas de azúcar [Anal. Biochem. 171:73, 1988; Seibutsukagaku Jikkenho (Biochemical Experimentation Methods) 23 - Totanpakushitsu Tosa Kenkyuho (Methods of Studies on Glycoprotein Sugar Chains), Gakkai Shuppan Center, editado por Reiko Takahashi, 1989].

El mapeado bidimensional de cadenas de azúcar es un método de deducción de una estructura de cadenas de azúcar, por ejemplo mediante representación gráfica del tiempo de retención o posición de elución de una cadena de azúcar mediante cromatografía de fase inversa en el eje X y el tiempo de retención o posición de elución de la cadena de azúcar en la cromatografía de fase normal en el eje Y, respectivamente, y la comparación de ellas con los resultados de las cadenas de azúcar conocidas.

Específicamente, se libera una cadena de azúcar a partir de un anticuerpo mediante hidrazinólisis del anticuerpo y se somete a marcaje fluorescente con 2-aminopiridina (en adelante denominada PA) [J. Biochem. 95:197, 1984]. Tras separarlo del reactivo de tratamiento PA adicional mediante filtración en gel, la cadena de azúcar se sometió a cromatografía de fase inversa.

A continuación, cada pico de la cadena de azúcar fraccionada se sometió a cromatografía de fase normal. La estructura de cadena de azúcar puede deducirse mediante la representación gráfica de los resultados obtenidos en un mapa bidimensional de las cadenas de azúcar y la comparación de ellos con los puntos de un estándar de cadena de azúcar (preparado por Takara Shuzo Co., Ltd.) o los publicados en la literatura [Anal. Biochem. 171:73, 1988].

La estructura deducida del mapeado bidimensional de cadenas de azúcar puede confirmarse llevando a cabo una espectrometría de masas, por ejemplo, EM MALDI-TOF, de cada cadena de azúcar.

La parte a la que se encuentra unida una cadena de azúcar en la región Fc del anticuerpo puede confirmarse llevando a cabo una aminación reductora del anticuerpo, seguida del tratamiento con endoproteasa del anticuerpo obtenido utilizando tripsina, pepsina, Lys-C o Asp-N, y la separación del fragmento obtenido utilizando cromatografía de fase inversa (CL) y el análisis del mismo mediante espectrometría de masas (EM).

Es decir, puede confirmarse si la cadena de azúcar se encuentra realmente unida o no mediante la comprobación de si los pesos moleculares de los péptidos obtenibles mediante el tratamiento con proteasa y el peso molecular del péptido al que se encuentra unida una cadena de azúcar corresponden a los valores del análisis de EM basado en la secuencia de aminoácidos de la región Fc objetiva.

5. Método para determinar la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo

La composición de anticuerpo de la presente invención comprende moléculas de anticuerpo que presentan diferentes estructuras de cadena de azúcar que se unen a Asn en la posición 297 de la región Fc del anticuerpo. De entre las composiciones de variante de anticuerpo de la presente invención, la composición de variante de anticuerpo en la que la proporción de cadenas de azúcar sin fucosa nuclear de entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo que se unen a Fc de la composición de variante de anticuerpo de la presente invención es de 20% o superior, muestra una actividad ADCC elevada. Dicha composición de anticuerpo puede determinarse utilizando el método de análisis de la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo descrita en 4, anteriormente. Además, también puede determinarse mediante un método inmunológico cuantitativo utilizando lectinas.

La determinación de la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo mediante un método inmunológico cuantitativo utilizando lectinas puede llevarse a cabo utilizando inmunoensayos tales como la tinción western, el RIA (radioinmunoensayo), el VIA (viroinmunoensayo), el IAE (inmunoensayo enzimático), FIA (fluorinmunoensayo) y MIA (metaloimunoensayo) descritos en el documento [Monoclonal Antibodies: Principles and

Applications, Wiley-Liss, Inc., 1995; Enzyme Immunoassay, 3a ed., Igaku Shoin, 1987; Enzyme Antibody Technique, Revised Edition, Gakusai Kikaku, 1985, y similares], por ejemplo de la manera siguiente.

Se marca una lectina que reconoce la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo que constituye una composición de anticuerpo, y la lectina marcada se somete a la reacción con una composición de anticuerpo de muestra, seguido mediante la medición de la cantidad de un complejo de la lectina marcada con la molécula de anticuerpo.

Entre los ejemplos de lectinas útiles para determinar la estructura de cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo se incluyen WGA (aglutinina de germen de trigo derivada de *T. vulgaris*), ConA (concanavalina A derivado de *C. ensiformis*), RIC (toxina derivada de *R. communis*), L-PHA (leucoaglutinina derivada de *P. vulgaris*), LCA (aglutinina de lenteja derivada de *L. culinaris*), PSA (lectina de guisante derivada de *P. sativum*), AAL (lectina de *Aleuria aurantia*), ACL (lectina de *Amaranthus caudatus*), BPL (lectina de *Bauhinia purpurea*), DSL (lectina de *Datura stramonium*), DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), EBL (lectina de baya de saúco) ECL (lectina de *Erythrina cristagalli*), EEL (lectina de *Euonymus europaeus*), GNL (lectina de *Galanthus nivalis*), GSL (lectina de *Griffonia simplicifolia*), HPA (aglutinina de *Helix pomatia*), HHL (lectina de *Hippeastrum híbrido*), jacalina, LTL (lectina de *Lotus tetragonolobus*), LEL (lectina de *Lycopersicon esculentum*), MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MPL (lectina de *Maclura pomifera*), NPL (lectina de *Narcissus pseudonarcissus*), PNA (aglutinina de cacahuete), E-PHA (eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), PTL (lectina de *Psophocarpus tetragonolobus*), RCA (aglutinina de *Ricinus communis*), STL (lectina de *Solanum tuberosum*), SJA (aglutinina de *Sophora japonica*), SBA (aglutinina de soja), UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), VVL (lectina de *Vicia villosa*) y WFA (aglutinina de *Wisteria floribunda*).

La utilización de una lectina que reconoce específicamente una fucosa nuclear resulta preferible. Entre los ejemplos de dichas lectinas se incluyen la lectina LCA de lenteja (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), PSA de lectina de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina VFA de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*) y lectina AAL de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*).

6. Utilización de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención

Debido a que la composición de variante de anticuerpo de la presente invención es una composición que comprende moléculas de variante de anticuerpo individuales en las que se reduce o se eliminan cadenas de azúcar que se unen a Asn en una posición diferente de la posición 297, la composición de variante de anticuerpo de la presente invención resulta muy útil para la producción de un fármaco proteico que se resulta necesario para producir moléculas de anticuerpo individuales.

Asimismo, entre las composiciones de anticuerpo de la presente invención, debido a que la composición de variante de anticuerpo que comprende una variante de Fc en la que Asn en la posición 392 se ha sustituido por Lys en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 en la que la proporción de cadenas de azúcar sin fucosa nuclear de entre el total de cadenas de azúcar en la composición es de 20% o superior, es una composición que comprende moléculas de variante de anticuerpo individual en las que las cadenas de azúcar unidas a Asn en una posición diferente de la posición 297 en la región Fc se reducen o eliminan y presenta una actividad de ADCC superior, presenta una propiedad más excelente en los efectos terapéuticos que las composiciones de anticuerpo convencionales.

Además, entre las composiciones de anticuerpo de la presente invención, debido a que la composición de variante de anticuerpo que comprende una variante de Fc en la que Asn en la posición 392 se ha sustituido por Lys en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 en la que la proporción de cadenas de azúcar sin fucosa nuclear de entre el total de cadenas de azúcar en la composición es de 20% o superior, es una composición que comprende moléculas de variante de anticuerpo individual en las que las cadenas de azúcar unidas a Asn en una posición diferente de la posición 297 en la región Fc se encuentran reducidas o eliminadas y presenta una actividad ADCC más elevada, que presenta propiedades más excelentes de los efectos terapéuticos que las composiciones de anticuerpo convencionales.

Además, debido a que la composición de variante de anticuerpo que comprende un anticuerpo que comprende una variante de Fc en la que Asn en la posición 392 se sustituye por Lys en la región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 en la que la proporción de cadenas de azúcar sin una fucosa nuclear es de 100%, es una composición que comprende moléculas de variante de anticuerpo individuales en las que las cadenas de azúcar unidas a Asn en una posición diferente de la posición 297 en la región Fc se encuentran reducidas o eliminadas, presenta una actividad de CDC más elevada que la IgG1 humana y la IgG3 humana y presenta una actividad ADCC más alta, el anticuerpo anteriormente indicado puede esperarse que presente efectos clínicos elevados.

Un medicamento que comprende la composición de variante de anticuerpo de la presente invención puede administrarse solo como agente terapéutico. Sin embargo, preferiblemente se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y se proporciona en forma de una preparación farmacéutica producida mediante un método arbitrario bien conocido en el campo técnico de los fármacos.

Resulta deseable administrar el medicamento por la vía que resulta más eficaz para el tratamiento. Entre las vías de administración adecuadas se incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración intraoral, la administración intratraqueal, la administración intrarrectal, la administración subcutánea, la administración intramuscular y la administración intravenosa. En el caso de una preparación de anticuerpo, resulta preferible la administración intravenosa.

El medicamento puede encontrarse en forma de un espray, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabe, emulsión, supositorio, inyección, pomada, cinta y similares.

Entre las preparaciones adecuadas para la administración oral se incluyen emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos.

Pueden prepararse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, utilizando, a modo de aditivos, agua, azúcares (por ejemplo sacarosa, sorbitol y fructosa), glicoles (por ejemplo polietilenglicol y propilenglicol), aceites (por ejemplo aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja), antisépticos (por ejemplo p-hidroxibenzoatos), saborizantes (por ejemplo saborizante de fresa y menta) y similares.

Pueden prepararse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares utilizando, a modo de aditivos, excipientes (por ejemplo lactosa, glucosa, sacarosa y manitol), agentes desintegrantes (por ejemplo almidón y alginato sódico), lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio y talco), ligantes (por ejemplo alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina), surfactantes (por ejemplo ésteres de ácido graso), plastificadores (por ejemplo glicerina) y similares.

Entre las preparaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se incluyen inyecciones, supositorios y esprays.

Pueden prepararse inyecciones utilizando portadores que comprenden una solución salina, una solución de glucosa, o una mezcla de los mismos, y similares. También resulta posible preparar inyecciones de polvos mediante liofilización de la composición de anticuerpo según un método convencional y la adición de cloruro sódico a la misma.

Pueden prepararse supositorios utilizando portadores tales como la manteca de cacao, grasa hidrogenada y ácido carboxílico.

La composición de anticuerpo puede administrarse como tal en forma de espray, o pueden prepararse esprays utilizando portadores que no estimulan la membrana mucosa oral o de las vías respiratorias de un receptor y que puede dispersar la composición de anticuerpo como partículas finas para facilitar la absorción de la misma.

Entre los portadores adecuados se incluyen lactosa, glicerina y similares. También resulta posible preparar aerosoles, polvos secos y similares según las propiedades de la composición de anticuerpo y los portadores utilizados. En la preparación de dichas preparaciones parenterales, también pueden añadirse los aditivos anteriormente indicados para las preparaciones orales.

La dosis y la frecuencia de administración variarán dependiendo del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, el periodo de tratamiento, la edad y el peso corporal del paciente, y similares. Sin embargo, una dosis apropiada del ingrediente activo para una persona adulta es generalmente de entre 10 µg/kg y 20 mg/kg al día.

Además, el efecto antitumoral de la composición de anticuerpo contra diversas células tumorales puede examinarse mediante ensayos in vitro, tal como la medición de la actividad CDC y la medición de la actividad ADCC. Además, entre los ejemplos de ensayos in vivo se incluyen experimentos antitumorales utilizando sistemas tumorales en un animal experimental tal como el ratón.

Las mediciones de actividad CDC y de actividad ADCC y los experimentos antitumorales pueden llevarse a cabo según los métodos descritos en el documento [Cancer Immunology Immunotherapy 36:373, 1993; Cancer Research 54:1511, 1994, y similares].

Ejemplos

A continuación se describe la invención basándose en ejemplos, aunque la invención no se encuentra limitada a los mismos.

Además, en los ejemplos a continuación, cada residuo de aminoácido se muestra mediante el código de tres letras o el código de una sola letra, N392K representa la variante de anticuerpo en la que se ha realizado la sustitución del aminoácido Asn (N) en la posición 392 según el índice EU por Lys (K).

[Ejemplo 1] Análisis de cadenas de azúcar de anticuerpos de alta actividad CDC

En la región Fc del anticuerpo humano es conocido que la cadena de azúcar se une a Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 297 a 299 según el índice EU, pero no es conocido que las cadenas de azúcar se unan a una secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido en posiciones diferentes de las posiciones 297 a 299.

Cada uno de los anticuerpos 1133, 113D, 113E, 113F, 113G y 113H que presentan una secuencia de CH de tipo alta actividad CDC descrita en el documento nº WO2007/011041 es un anticuerpo en el que dominios enteros o parciales de la región Fc de la IgG1 humana y de la región Fc de la IgG3 humana han sido sustituidas, y debido a que la posición 392 según el índice EU en el dominio CH3 es la Asn, se encuentra presente la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido Asn-X-Ser/Thr.

Además, el anticuerpo IgG3 humano natural también presenta la misma secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido Asn-X-Ser/Thr. De acuerdo con lo anterior, con el fin de examinar si se encuentra unida una cadena de azúcar o no a Asn392 del anticuerpo IgG3 humano y el anticuerpo con intercambio de dominios IgG1/IgG3 descrita en el documento nº WO2007/011041, se llevó a cabo el análisis de cadenas de azúcar de dichos anticuerpos.

Debido a que el anticuerpo con intercambio de dominios de IgG1/IgG3, se utilizó el anticuerpo GM2-113F anti-GM2 de tipo 113F descrito en el documento nº WO2007/011041. Tal como se muestra esquemáticamente en las figura 2(a) a (c), la estructura del anticuerpo 113F es un anticuerpo que presenta una estructura en la que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 118 a 230 en CH comprende una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humano y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 231 a 422 comprende una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG3 humano y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 423 a 447 comprende una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humana (SEC ID nº 2).

Debido a que el anticuerpo de tipo IgG3 humano, KM3523, en el que la CH de un anticuerpo híbrido anti-CD20 de tipo IgG1/k Rituximab (patente US nº 5.736.137) se modificó de manera que se convirtiese en tipo IgG3 humano (Journal of Immunological Methods 306:151-60, 2005) y se utilizó el anticuerpo IgG3 humano natural purificado a partir de la preparación IVIG (inmunoglobulinas intravenosas).

En primer lugar, se llevó a cabo el SDS-PAGE de GM2-113F y KM3523 bajo condiciones reductoras utilizando gel al 8% (Novex). Se muestran los resultados en la figura 3.

Tal como se muestra en la figura 3, se detectó una banda menor (banda A) inmediatamente en la parte superior de la banda de la cadena H de GM2-113F (banda B). Además, al medir el peso molecular de GM2-113F utilizando un cromatógrafo líquido-espectrómetro de masas (CL-EM), un componente que presenta un peso molecular aproximadamente 1.380 Da más grande además del peso molecular correspondiente a GM2-113F (aproximadamente 148 kDa).

Por otra parte, la banda de la cadena H de KM3523 y el anticuerpo IgG3 humano natural mostraba un peso molecular único.

Debido a que Asn392 y Thr394 son secuencias de consenso de cadena de azúcar unidas mediante enlace N-glucósido tal como se ha indicado anteriormente, se ha sugerido la posibilidad de que una cadena de azúcar de tipo N rica en manosa ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, peso molecular: 1.378,48, en adelante denominada cadena de azúcar de tipo Man6) se une a Asn392 del anticuerpo de tipo 113F, se llevó a cabo un análisis detallado a continuación.

Se disolvió GM2-113F y KM3523 en tampón Tris-HCl 0,1 moles/l (pH 8,0) que contenía hidrócloruro de guanidina 6 moles/l, se añadió ditiotritol (fabricado por Nacalai Tesque) a lo anterior, proporcionando una concentración final de 1,8 mg/ml y la reacción de reducción se llevó a cabo a 56°C durante 1 hora. Se añadió yodoacetamida (fabricada por Nacalai Tesque) a la solución tras la reacción, proporcionando una concentración final de 11 mg/ml y se llevó a cabo la reacción de alquilación a 37°C durante 1 hora en la sombra.

A continuación, se sustituyó el líquido de reacción por un tampón para la digestión enzimática (1 mol/l de urea, 0,1 moles/l de NH_4HCO_3) utilizando una membrana de ultrafiltración, se añadió además una solución de Asp-N (grado de secuenciación, fabricado por Roche) (E/S=1/50), seguido de la digestión a 37°C durante 16 horas y la reacción se detuvo mediante la adición de una cantidad apropiada de 1 mol/l de HCl.

Se analizaron mediante CL-EM los fragmentos peptídicos obtenidos mediante la digestión con Asp-N. Es decir, se separó la mezcla de fragmentos peptídicos mediante un gradiente de densidad lineal de la fase móvil A (TFA al 0,1%) a la fase móvil B (TFA al 0,1%, CH_3CN al 90%) utilizando una HPLC inversa (columna utilizada: YMC Pro C18, 1 mm de diámetro x 250 mm, fabricada por YMC, caudal: 60 µl/min.).

Se examinaron los eluidos utilizando un espectrómetro de masas (LTQ Orbitrap, fabricado por Thermo Scientific) mediante electropulverización y se midió el peso molecular de cada fragmento peptídico.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando un software (Xcalibur Qual Browser) unido al espectrómetro de masas y los picos de un ión molecular ($m/z=1.296,58$, $z=2$) de un fragmento peptídico que contenía Asn392 (secuencia DIAVEWESSGQPFNNYNTTPML) y de un ión molecular ($m/z=1.985,81$, $z=2$) en el que un peso molecular ($m/z=689,24$, $z=2$) correspondiente a la cadena de azúcar de tipo Man6 se encuentra unido al fragmento peptídico se extrajeron y se expresan numéricamente sus intensidades de señal en forma de valores. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

La Tabla 1 muestra un resultado del análisis de CL-EM de los fragmentos peptídicos que contienen Asn392, obtenidos mediante el mapeado de los péptidos GM2-113F y KM3523. Cada valor numérico en la Tabla 1 muestra la intensidad de señal del espectrómetro de masas. N.D. indica la no detección de señal.

[Tabla 1]

Resultados del análisis de CL-EM de fragmentos peptídicos que contienen Asn de GM-2-113F y KM35223

	Intensidad de señal del péptido al que no se une ninguna cadena de azúcar de tipo N-glucósido	Intensidad de señal de péptido al que se encuentra unida cadena de azúcar de tipo Man6
GM2-113F	$2,42 \times 10^6$	$1,16 \times 10^5$
KM3523	$3,03 \times 10^6$	N.D.

Tal como se muestra en la Tabla 1, se detectó en GM2-113F un ión molecular al que se añadió la cadena de azúcar de tipo Man6. Por otra parte, no se detectó en KM3523 la señal de la adición de cadena de azúcar. Basándose en lo anterior, se consideró que la modificación de la cadena de azúcar en Asn392 es un fenómeno específico de GM2-113F.

Suponiendo que una molécula de cadena de azúcar de tipo Man6 se encuentra unida a una molécula de anticuerpo, basándose en los resultados de las mediciones de CL-EM de GM2-113F, se consideró a partir de los resultados mostrados en la Tabla 1 que el anticuerpo con unión de cadena de azúcar de tipo Man6 constituye aproximadamente 10% de toda la composición de anticuerpo.

Basándose en lo anteriormente expuesto, se reveló que a pesar de que cada anticuerpo que presenta la misma secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido, cada cadena de azúcar de tipo N-glucósido no se encontraba unida a Asn392 de la región constante de la cadena H del anticuerpo IgG3 humana, aunque por otra parte, la cadena de azúcar de tipo Man6 se encontraba unida a Asn en la posición 392 del anticuerpo de tipo 113F en una proporción constante.

[Ejemplo 2] Diseño y preparación de variantes de anticuerpo

1. Diseño de secuencias de variante

Con el fin de evitar la cadena de azúcar unida a Asn392 de la región constante de la cadena H de tipo 113F tal como se muestra en el Ejemplo 1, se prepararon 46 tipos de variante de anticuerpo con sustituciones de aminoácido mediante la eliminación de la secuencia de consenso de cadena de azúcar unida a N-glucósido sustituyendo Asn392, Thr393 y/o Thr394 por otros aminoácidos (Tablas 2 y 3, posteriormente).

Además, en algunas variantes de anticuerpo, se verificaron influencias sobre las actividades biológicas de las variantes de anticuerpo mediante la modificación de los residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo IgG3 humano, posiciones 276, 339 y 397 de la región Fc del tipo 113F.

La figura 4 es la alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena H del anticuerpo IgG1 humano, del anticuerpo IgG3 humano y del anticuerpo de tipo 113F, y muestra 6 secuencias de aminoácidos de regiones Fc de tipo 113F modificadas en el presente estudio.

Entre ellas, los cuatro residuos Lys276, Thr339, Asn392 y Met397 son residuos de aminoácidos diferentes entre el anticuerpo IgG1 humano y el anticuerpo IgG3 humano. A este respecto, se utilizó una secuencia de tipo K humana como secuencia de ADN de la CL y se utilizó una secuencia idéntica al anticuerpo anti-CD20 humano Rituximab (patente US nº 5.736.137) como secuencia de ADN de la región V.

2. Preparación de variantes de anticuerpo

(1) Construcción de vector de expresión

En la figura 5 se muestra un esquema de la construcción del vector de expresión.

Se utilizó el kit PrimeSTAR Mutagenesis Basal (Takara Shuzo Co. Ltd.) en la introducción de la mutagénesis dirigida a sitio en un ADN codificante de la CH de las variantes de anticuerpo indicadas posteriormente. Como cebadores, se diseñaron secuencias para introducir la sustitución de diversos residuos de aminoácidos en la región CH (Tabla 1) y se sintetizaron siguiendo las instrucciones adjuntas con el kit (fabricado por Invitrogen).

El vector pKTX93/113F descrito en el documento nº WO2007/011041 se utilizó como molde. Mediante la realización de la PCR utilizando dichos cebadores y molde, se obtuvo un vector que presentaba la mutación deseada en la secuencia génica de la región constante de la cadena H.

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con dos sustituciones de aminoácido, en la que se había combinado la sustitución de aminoácido N392K con una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de entre 276, 339, 393 y 397, se obtuvo mediante la utilización del vector de expresión de variante de anticuerpo con una mutación N392K (pKTX93/113F-N392K) como molde mediante el procedimiento anteriormente indicado y llevando a cabo la misma operación.

La secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena H que comprendía la mutación de interés se transfirió a pKTX93/113F utilizando Apal y NruI (fabricado por New England Biolabs).

(2) Preparación de células productoras de anticuerpos

Las células se cultivaron a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. Con el fin de obtener un anticuerpo de defucosilación de tipo alta ADCC, se utilizó una célula CHO/DG44 en la que se había inactivado la α 1,6-fucosiltransferasa (en adelante denominado célula FUT8KO) (patente US nº 6.946.292).

En 1,6x10⁶ células de la célula FUT8KO se introdujeron 4 µg del vector de expresión mediante el método de electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], seguido del cultivo utilizando IMDM-(10) [medio IMDM (GIBCO) que contenía suero de feto bovino dializado al 10% (dFBS)]. Dos días después del cultivo se sustituyó el medio por IMDM-(10) que comprendía G418 sulfato (fabricado por Nacalai Tesque) a una concentración de 0,5 mg/ml [en adelante denominado IMDM-(10G)], se continuó el cultivo celular y se identificó la célula resultante como célula resistente a G418.

(3) Expresión y purificación de anticuerpos

El anticuerpo de tipo 113F purificado y las variantes de anticuerpo purificadas que se muestra en la Tabla 2 se obtuvieron mediante el método siguiente. Tras suspender las células resistentes a G418 obtenidas en el párrafo anterior en IMDM-(10G) hasta una densidad de 3x10⁵ células/ml y cultivadas durante 3 días, se cultivaron con medio Ex-cell 302 (SAFC Biosciences) durante 7 a días, seguido de la recuperación del sobrenadante del cultivo.

El sobrenadante de cultivo obtenido en el párrafo anterior se pasó por una columna rellena con 0,5 ml de portador MabSelect SuRe (GE Healthcare) a un caudal de entre 0,5 ml/min. y 1,0 ml/min. Tras lavar mediante la adición de 3 ml de tampón borato (borato sódico 0,2 M y cloruro sódico 150 mM) y 0,25 ml de solución de citrato sódico 0,1 M (pH 3,6) en orden, se recuperó la fracción eluida con 1,5 ml de solución de citrato sódico 0,1 M (pH 3,6) en forma de una fracción de elución en bruto.

Por una columna rellena con 10 ml de Econo-Pac 10DG (BIO RAD), se pasaron 1,5 ml de la fracción de elución en bruto. Tras lavar con 1,5 ml de tampón citrato (cloruro sódico 150 mM y citrato sódico 10 mM, ajustado a pH 6,0 con hidróxido sódico), se recuperó la fracción eluida con 3,0 ml del mismo tampón citrato en forma de solución de anticuerpo.

(4) Análisis de SDS-PAGE de las variantes de anticuerpo

Entre las variantes de anticuerpo mostradas en las Tablas 2 y 3, se llevó a cabo el análisis de SDS-PAGE de todos los anticuerpos purificados excepto N392K/K276S mediante el método siguiente. Cada solución de anticuerpo preparada en 0,1 mg/ml con un tampón para muestras que contenía 0 mM (condiciones no reductoras) o 10 mM (condiciones reductoras) de ditiotreitól [0,3 M de Tris-HCl (pH 6,89), dodecilsulfato sódico al 10% y glicerol al 50%] y se trataron a 100°C durante 5 minutos y se aplicaron a un gel de poliacrilamida (Atto Corp.) en un volumen de 10 µl por carril y se sometieron a electroforesis con 20 mA por placa de gel durante 2 horas. Se recuperó el gel y después se tiñó utilizando la tinción CBB uno (Nacalai Tesque) siguiendo las instrucciones adjuntas con el artículo fabricado.

Mediante la SDS-PAGE de las muestras bajo condiciones no reductoras, se observaron patrones de bandas similares a las del anticuerpo de tipo 113F en todas las variantes de anticuerpo, mostrando de esta manera que no existían problemas de pureza de los productos purificados. Como resultado de la SDS-PAGE de las muestras tratadas con reducción, se observó una banda menor en el lado de peso molecular alto de la cadena H en el carril de 113F. Sin embargo, esta misma banda desapareció en el carril de la variante de anticuerpo, se encontró que la cadena de azúcar unida al residuo Asn en la posición 392 se había eliminado de las variantes de anticuerpo preparadas.

[Ejemplo 3] Evaluación de actividad de variantes de anticuerpo**1. Medición de la actividad CDC**

Se midió la actividad CDC de las variantes de anticuerpo utilizando una célula transformada, KC1156 preparada mediante la introducción del gen CD20 humano en una línea celular de timoma de ratón EL4 [Clin. Cancer Res. 11:2327, 2005] y la célula tumoral positiva para CD20, la célula Daudi (JCRB), Raji (JCRB), ST486 (ATCC), EHEB (DSMZ) y MEC-1 (DSMZ) como célula diana.

Se utilizó el anticuerpo anti-CD20 Rituximab (patente US nº 5.736.137) como control de los anticuerpos que comprendían una región constante de cadena H de IgG1. Se diluyó cada célula diana hasta alcanzar una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml utilizando RPMI 1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía FBS al 10% (JRH), 50 µl de cada célula diluida, se dispensaron 50 µl de solución de anticuerpo de concentración ajustada a 3 veces la concentración final y 50 µl de un complemento humano (Sigma) diluido 2 veces u 8 veces en el caso de EL47CD20-A, respectivamente, en cada uno de los pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), en cada uno de los pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.).

Además, se preparó un pocillo que no contenía anticuerpo como pocillo de 0% de reacción y se preparó un pocillo que no contenía célula diana como pocillo de 100% de reacción. Tras cultivar a 37°C (5% de CO₂) durante 2 horas, se añadió WST-1 (ROCHE) en 15 µl de cada uno de los pocillos de reacción y se cultivaron a 37°C (5% de CO₂) durante 3 horas. Tras completar la reacción, se midió la DO450 de cada pocillo y se calculó la citotoxicidad (%) utilizando la fórmula siguiente.

Citotoxicidad (%) = $100 \times \{1 - (\text{absorbancia del pocillo de reacción} - \text{absorbancia de 100\% de pocillo de reacción}) / (\text{absorbancia del pocillo de 0\% de reacción} - \text{absorbancia del pocillo de 100\% de reacción})\}$.

Con el fin de comparar la actividad CDC de todas las variantes de anticuerpo bajo las mismas condiciones, se midió la actividad CDC utilizando KC1156 a una concentración de anticuerpo de 1 µg/ml en todas las muestras en la misma placa, mostrando los resultados en las Tablas 2 y 3.

[Tabla 2]

Variante de anticuerpo	Residuo de aminoácido						Actividad CDC*
	Lys276	Thr339	Asn392	Thr393	Thr394	Met397	
N392F			Phe				+
N392L			Leu				+
N392I			Ile				+
N392M			Met				+
N392V			Val				+
N392P			Pro				+
N392A			Ala				+
N392Y			Tyr				+
N392H			His				+
N392Q			Gln				+
N392K			Lys				+
N392D			Asp				+
N392E			Glu				+
N392W			Trp				+
N392R			Arg				+
N392G			Gly				+
T393P				Pro			++
T394Y					Tyr		++
T394L					Leu		+
T394F					Phe		++
T394D					Asp		+
T394K					Lys		+
T394N					Asn		+

* El caso en que la actividad CDC de la variante de anticuerpo es igual o superior a la del anticuerpo de tipo 113F se representa como "++" o "+" y el caso en que la actividad CDC es inferior a la del anticuerpo de tipo 113F se representa como "-".

[Tabla 3]

Variante de anticuerpo	Residuo de aminoácido						Actividad CDC*
	Lys276	Thr339	Asn392	Thr393	Thr394	Met397	
N392K/T393A			Lys	Ala			+
N392K/K276F	Phe		Lys				-
N392K/K276S	Ser		Lys				-
N392K/T339N		Asn	Lys				-
N392K/T339Y		Tyr	Lys				++
N392K/M397F			Lys			Phe	+
N392K/M397L			Lys			Leu	-
N392K/M397I			Lys			Ile	-
N392K/M397V			Lys			Val	-
N392K/M397S			Lys			Ser	-
N392K/M397P			Lys			Pro	-
N392K/M397T			Lys			Thr	-
N392K/M397A			Lys			Ala	-
N392K/M397Y			Lys			Tyr	-
N392K/M397H			Lys			His	-
N392K/M397Q			Lys			Gln	+
N392K/M397K			Lys			Lys	-
N392K/M397D			Lys			Asp	+
N392K/M397E			Lys			Glu	-
N392K/M397W			Lys			Trp	-
N392K/M397R			Lys			Arg	-
N392K/M397G			Lys			Gly	-
N392K/M397N			Lys			Asn	+

* El caso en que la actividad CDC de la variante de anticuerpo es igual o superior a la del anticuerpo de tipo 113F se representa como "++" o "+" y el caso en que la actividad CDC es inferior a la del anticuerpo de tipo 113F se representa como "-".

- 5 Tal como se muestra en las Tablas 2 y 3, la actividad CDC de T393P, T394Y, T394F y N392K/T339K era superior a la de 113F antes de la sustitución. Además, las sustituciones en las posiciones 392 y 397 se llevaron a cabo exhaustivamente y se encontró que las variantes de anticuerpo de Asn392 mostraban un nivel de actividad CDC igual o superior que la de 113F y algunas de las variantes de anticuerpo de met397 presentaban una tendencia a reducir la actividad.
- 10 Se llevó a cabo la medición de la actividad CDC del transfectante de CD20 KC1156 en mayor detalle en N392K, T394Y y T394F. Se muestran los resultados en las figura 6(a) y (b).
- 15 Tal como se muestra en la figura 6, la actividad CDC de N392K era equivalente a la del anticuerpo de tipo 113F antes de la sustitución. Además, se observó un incremento significativo de la actividad CDC en T394Y y T39F en comparación con el anticuerpo de tipo 113F.
- Se midió la actividad CDC de N392K, T394Y, T394F y N392K/T339Y de las células tumorales positivas para CD20, mostrando los resultados en las figura 7(a) a (e).
- 20 Tal como se muestra en las figura 7(a) a (e), similar a la actividad CDC de las células tumorales positivas para CD20, N392K mostraba un nivel de actividad CDC equivalente a la del anticuerpo de tipo 113F y se observó un incremento de la actividad CDC en T394Y, T394F y N392K/T339Y en comparación con la sustitución de anticuerpo de tipo 113F.
- 25 2. Actividad de unión del complemento
- Se midió con un citómetro de flujo una actividad de unión de un primer componente de complemento C1q con variantes de anticuerpo. A modo de controles comparativos, se utilizó el anticuerpo de tipo 113F y un anticuerpo de tipo IgG1 Rituximab. Con RPMI 1640 (GIBCO), se dispensaron 50 µl de células Daudi diluidas a $1,5 \times 10^7$ células/ml y 50 µl de cada solución de anticuerpo a una concentración ajustada a 3 veces la concentración final, en cada uno de los pocillos de una placa de fondo en U de 96 pocillos (FALCON) y se dejaron en reposo a 37°C (5% de CO₂) durante 10 minutos y después se añadió suero humano (SIGMA) a 6% a un volumen de 50 µl a cada uno de los pocillos y se dejó en reposo a 37°C (5% de CO₂) durante 15 minutos.
- 30
- 35 Tras lavar dos veces con PBS, se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-C1q humano marcado con FITC (Dako Cytomation) diluido 100 veces con un tampón FACS [BSA al 1%, ácido etilen-diamín-tetraacético al 0,02% y azida sódica al 0,05%, disuelto en PBS] a los pocillos respectivos y se dejaron reaccionar a 4°C durante 30 minutos bajo

sombra.

Las células se lavaron dos veces con 200 µl del tampón para FACS y se suspendieron en 200 µl del tampón para FACS y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un aparato Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter).

A este respecto, se calculó la concentración efectiva al 50% (EC₅₀) fijando el valor mínimo en 0 en la logística de reacción de administración (dosersplgst) de KaleidaGraph (HULINKS, Inc.). Se muestran los resultados en la figura 8.

Además, se muestran en la Tabla 4 los valores de EC₅₀ calculados a partir del gráfico. La Y_{max} en la Tabla 4 representa el valor mínimo de la curva de aproximación.

[Tabla 4]

Variante de anticuerpo	Actividad de unión a C1q	
	EC ₅₀ (µg/ml)	Y _{max} (IMF)
113F	3,39	106,6
N392K	3,19	101,3
T394Y	2,52	120,7
T394F	2,77	119,6
Rituximab	6,16	35,3

Tal como se muestra en la figura 8 y en la Tabla 4, la actividad de unión a C1q de N392K es equivalente a la de 113F. Mediante este análisis, se incrementó adicionalmente la actividad de unión a C1q de T394F y de T394Y respecto a la del anticuerpo de tipo 113F antes de la sustitución.

3. Actividad ADCC

Se midió la actividad ADCC de las variantes de anticuerpo preparadas en el Ejemplo 2 anteriormente indicado mediante el método descrito en el documento nº WO2007/011041. Debido a que todas las variantes de anticuerpo preparadas eran anticuerpos de tipo alta ADCC sin fucosa nuclear, se utilizó Rituximab como control negativo.

Se utilizaron las células tumorales positivas para CD20 Daudi, Raji y ST486 como células diana, y se utilizaron CMSP preparadas a partir de un donante sano como la célula efectora.

El ensayo se llevó a cabo a una proporción de células efectoras a células diana de 1:20, 1:25 o 1:30, y se calculó la citotoxicidad (%) mediante la fórmula siguiente.

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \times (S - Ab) / (Max - T)$$

S=absorbancia del pocillo de reacción de muestra - absorbancia del pocillo de medio

Ab=absorbancia del pocillo sin adición de anticuerpo - absorbancia del pocillo de medio

T=absorbancia del pocillo diana - absorbancia del pocillo de medio

Max=absorbancia del pocillo de 100% de reacción - absorbancia del pocillo de control de 100% de reacción

Como resultado, la actividad ADCC de N392K, T394F y T394Y era equivalente a la del anticuerpo de tipo 113F y se incrementó significativamente en comparación con Rituximab.

4. Preparación de FcRn y proteína β₂-microglobulina

Con el fin de preparar una proteína con etiqueta histidina (una secuencia de aminoácidos continuada con 6 residuos de His) en el extremo C-terminal de un receptor de Fc fetal humano soluble (FcRn), se amplificó un ADNc codificante de una proteína con etiqueta histidina en el extremo C-terminal del dominio de membrana celular de la cadena α de FcRn, llevando a cabo una PCR con un cebador FcRn fw (SEC ID nº 4) y un cebador FcRn rv (SEC ID nº 5) y utilizando una biblioteca de ADNc derivada de placenta humana (fabricada por Clontech) como molde.

Se llevó a cabo la PCR basándose en las instrucciones adjuntas a la polimerasa KOD (fabricada por Toyobo Co., Ltd.), obteniendo de esta manera un plásmido pCRFcRnα (fabricado por Toyobo Co., Ltd.), obteniendo de esta manera un plásmido pCRFcRnα que comprende un ADNc codificante de una proteína que contiene etiqueta histidina en el extremo C-terminal de FcRnα.

Por otra parte, la construcción de un ADNc codificante de β₂-microglobulina humana se llevó a cabo basándose en el procedimiento siguiente. Mediante la preparación de cuatro ADN sintéticos que cubrían la secuencia de ADN de la β₂-microglobulina humana, se llevó a cabo la PCR de la manera indicada anteriormente con el fin de obtener un plásmido pCRB2M que comprendía un ADN codificante del ADNc de la β₂-microglobulina humana.

A continuación, el vector de expresión de anticuerpo humanizado para las células animales, pKANTEX93, descrito

en el documento nº WO97/10354, se digirió con los enzimas de restricción NotI y BamHI para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 11 Kpb en el que se había eliminado una región de ADNc codificante de la región constante de cadena pesada del anticuerpo humano.

Por otra parte, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb codificante de la β_2 -microglobulina humana mediante la digestión de pCRB2M con los enzimas de restricción NotI y BamHI. Este fragmento de ADN de aproximadamente 11 Kpb y el fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb se ligó utilizando Ligation High (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) y el ADN obtenido se introdujo en *Escherichia coli* DH5 α (fabricado por Toyobo Co., Ltd.), construyendo de esta manera un plásmido pKANTEXB2M.

A continuación, se digirió pKANTEXB2M con los enzimas de restricción EcoR y DraIII, recuperando un fragmento de plásmido de aproximadamente 11 Kpb en el que se había eliminado un ADNc codificante de la región constante de cadena ligera del anticuerpo humano. Por otra parte, se recuperó un ADNc codificante de una cadena FcRn α de aproximadamente 0,9 Kpb obtenido mediante digestión del plásmido pCRFcRn α con EcoRI y DraIII.

El fragmento de ADN indicado anteriormente de aproximadamente 11 Kpb y un fragmento de ADN de aproximadamente 0,9 Kpb se ligaron utilizando Ligation High y después el ADN obtenido se introdujo en *E. coli* DH5 α , obteniendo de esta manera un plásmido pKANTEXFcRnHis.

El plásmido obtenido de esta manera se convirtió en una cadena lineal mediante la digestión con un enzima de restricción AatII (fabricado por New England BioLab) y después se utilizó para la introducción en una célula. Tras la digestión, el líquido de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el plásmido se había convertido con precisión en una cadena lineal.

Se preparó una célula en la que se coexpresaban FcRn y β_2 -microglobulina de la manera indicada anteriormente y se cultivó. Tras el cultivo, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se llevó a cabo la purificación de la FcRn de tipo soluble utilizando una columna de Ni-NTA agarosa (fabricada por QIAGEN) siguiendo las instrucciones adjuntas a la misma con el fin de obtener una proteína compleja de la proteína FcRn soluble y la β_2 -microglobulina.

La proteína compleja obtenida de esta manera de proteína FcRn soluble y β_2 -microglobulina se utilizó como FcRn soluble.

5. Actividad de unión a FcRn

Es conocido que la semivida en sangre de un anticuerpo se relaciona con la actividad de unión del mismo al receptor de Fc neonatal (FcRn) presente en el endosoma a pH 6,0 y pH 7,4 [J. Immunol. 176:346, 2006].

Con el fin de examinar la influencia de las sustituciones de aminoácido en las variantes de anticuerpo sobre la semivida en sangre, se evaluó la actividad de unión a FcRn de las variantes de anticuerpo a pH 6,0 o a pH 7,4 con un aparato Biacore T-100 (GE Healthcare).

Como controles se utilizaron Rituximab y Rituximab que comprendía una secuencia de variante de IgG (T250Q/M428L) [J. Immunol. 176:346, 2006] y que presentaba una actividad de unión a FcRn incrementada dada a conocer en referencias conocidas.

Se dejó que el anticuerpo anti- β_2 -microglobulina (fabricado por Abcam) diluido hasta 10 μ g/ml con acetato 5,5 reaccionase a un caudal de 10 μ l/min. durante 420 segundos y se fijó en un chip sensor CM5 (GE Healthcare) mediante el método de acoplamiento de aminas (cantidad diana: 10.000 UR).

Además, utilizando tampón HBS-EP+ (GE Healthcare) ajustado a pH 6,0 o a pH 7,4, se dejó que reaccionase 1 μ g/ml de FcRn soluble a un caudal de 5 μ l/min. durante 24 segundos para la captura en la superficie del chip sensor (cantidad diana: 100 UR).

Se diluyó cada anticuerpo con tampón HBS-EP+ a pH 6,0 o a pH 7,4 y se dejó que reaccionase a un caudal de 30 μ l/min. durante 120 segundos y se midió la reacción de asociación-disociación. Se regeneró el chip sensor mediante la reacción con glicina-HCl pH 2,0 a un caudal de 60 μ l/min. durante 60 segundos.

Se calculó el valor de K_D mediante el análisis con un software de evaluación de T-100 (GE Healthcare) utilizando el modelo de unión bivalente.

Se muestran en la Tabla 5 las diversas constantes de reacción de las variantes de anticuerpo a pH 6,0.

[Tabla 5]

Ensayo 1	$ka_1 (\times 10^5 \text{ 1/Ms})$	$kd_1 (\text{1/s})$	$K_D (\times 10^{-8} \text{ M})$
T250Q/M428L	5,23	0,021	3,99
Rituximab	3,25	0,127	38,9
N392K	4,71	0,166	35,2
T394Y	2,83	0,124	43,9
T394F	3,18	0,132	41,3

Ensayo 2	$ka_1 (\times 10^5 \text{ 1/Ms})$	$kd_1 (\text{1/s})$	$K_D (\times 10^{-8} \text{ M})$
T250Q/M428L	3,68	0,034	9,98
Rituximab	3,96	0,236	59,6
113F	2,44	0,143	58,5
N392K	3,26	0,146	44,8

5 Tal como se muestra en la Tabla 5, la tasa de reacción K_D de N392K, T394Y y T394F a pH 6,0 era equivalente a la del anticuerpo de tipo 113F y la del Rituximab. Además, no se observó actividad de unión a pH 7,4 en ninguno de los anticuerpos.

10 La presente solicitud se basa en la solicitud de patente provisional US nº 61/309.631, presentada el 2 de marzo de 2010.

15 SEC nº 1: secuencia de aminoácidos de la región Fc de 113F
 SEC nº 2: secuencia de aminoácidos de la región constante de 113F
 SEC nº 3: secuencia de aminoácidos de la región constante de N392K
 SEC nº 4: secuencia de nucleótidos de cebador fw de FcRn
 SEC nº 5: secuencia de nucleótidos de cebador rv de FcRn

20 Listado de secuencias

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<120> Composiciones de variante de anticuerpo

25 <130> W501764

<150> US61/309631

<151> 2010-03-02

30 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> región Fc de 113F

ES 2 602 971 T3

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región constante de 113F

ES 2 602 971 T3

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
145 150 155 160

ES 2 602 971 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región constante de N392K

10

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

ES 2 602 971 T3

35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80		
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110		
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125		
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140		
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp 145 150 155 160		
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175		
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190		
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205		
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly 210 215 220		
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 225 230 235 240		
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325 330		

<210> 4

5 <211> 102

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial, cebador FcRn fw

ES 2 602 971 T3

```

<400> 4
agtaaacctg aatcttttga gtacgctgga tagcctccag gccagaaaga gagagtagcg      60

cgagcacagc taaggccacg gagcgagaca tggtagagggg tc                          102

<210> 5
5 <211> 120
  <212> ADN
  <213> Artificial

10 <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial, cebador FcRn rv

<400> 5
tccaaagatt caggtttact cacgtcatcc agcagagaat ggaaagtcaa atttcctgaa      60

ttgctatgtg tctgggtttc atccatccga cattgaagtt gacttactga agaattggaga     120

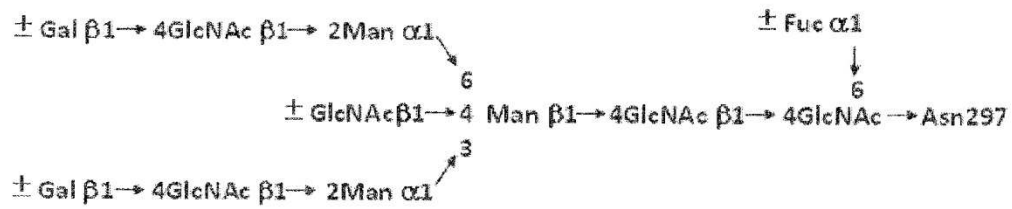
```

REIVINDICACIONES

1. Composición de variante de anticuerpo y fragmento de la composición de variante de anticuerpo, que comprende los residuos de aminoácidos de una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X representa un residuo de aminoácido diferente de Pro) en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, realizándose en dicha secuencia Asn-X-Ser/Thr por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido de Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido de X por Pro y una sustitución de aminoácido de Ser/Thr por otro residuo de aminoácido, en la/el que la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) son los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU, y en la/el que la región Fc de un anticuerpo IgG humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1.
2. Composición de variante de anticuerpo o fragmento de la composición de variante de anticuerpo según la reivindicación 1, en la/el que por lo menos un residuo de aminoácido de los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:
 - la posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp;
 - la posición 393 según el índice EU: Pro;
 - la posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.
3. Composición de variante de anticuerpo o fragmento de la composición de variante de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende un dominio CH1 y un dominio bisagra, en la/el que el dominio CH1 y el dominio bisagra comprenden una secuencia de aminoácidos derivada del anticuerpo IgG1 humano.
4. Composición de variante de anticuerpo o fragmento de la composición de variante de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región Fc en la que Thr en la posición 339 según el índice EU se sustituye con un residuo de aminoácido de Asn o Tyr y/o Met en la posición 397 según el índice EU se sustituye con por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre Gln, Asn, Asp y Phe.
5. ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la composición de variante de anticuerpo o el fragmento de la composición de variante de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector que comprende el ADN según la reivindicación 5.
7. Transformante que puede obtenerse introduciendo el vector según la reivindicación 6 en una célula anfitriona.
8. Procedimiento para producir la composición de variante de anticuerpo o el fragmento de la composición de variante de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 7 en un medio para formar y acumular la composición de variante de anticuerpo o el fragmento de la composición de variante de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el cultivo, y purificar la composición de variante de anticuerpo o el fragmento de la composición de variante de anticuerpo a partir del cultivo.
9. Método para reducir las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que se encuentran unidas al residuo Asn en una secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que una cadena de azúcar unida a N-glucósido se encuentra unida a un residuo Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X es un residuo de aminoácido diferente de Pro) en las posiciones 392 a 394 según el índice EU en la región Fc del anticuerpo IgG humano, comprendiendo dicho método realizar por lo menos una sustitución de aminoácido seleccionada de entre una sustitución de aminoácido de Asn por otro residuo de aminoácido, una sustitución de aminoácido de X por Pro y una sustitución de aminoácido de Ser/Thr por otro residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos en la secuencia Asn-X-Ser/Thr.
10. Método según la reivindicación 9, en el que por lo menos un residuo de aminoácido de los residuos de aminoácidos en las posiciones 392 a 394 según el índice EU se sustituye por los residuos de aminoácidos siguientes:
 - posición 392 según el índice EU: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Asp, Gln, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr o Trp;
 - posición 393 según el índice EU: Pro;
 - posición 394 según el índice EU: Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Tyr o Trp.

Fig. 1

(a)



(b)

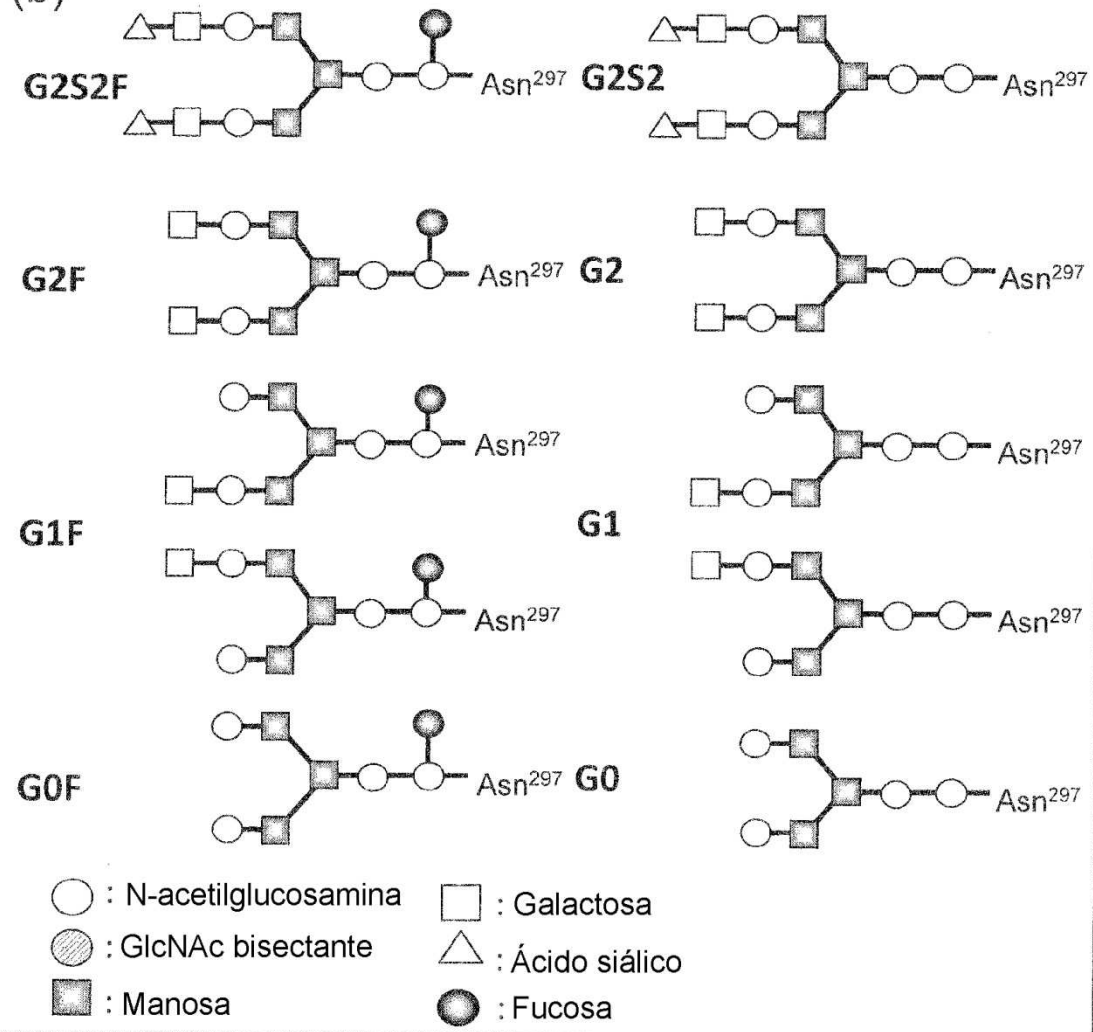


Fig. 2

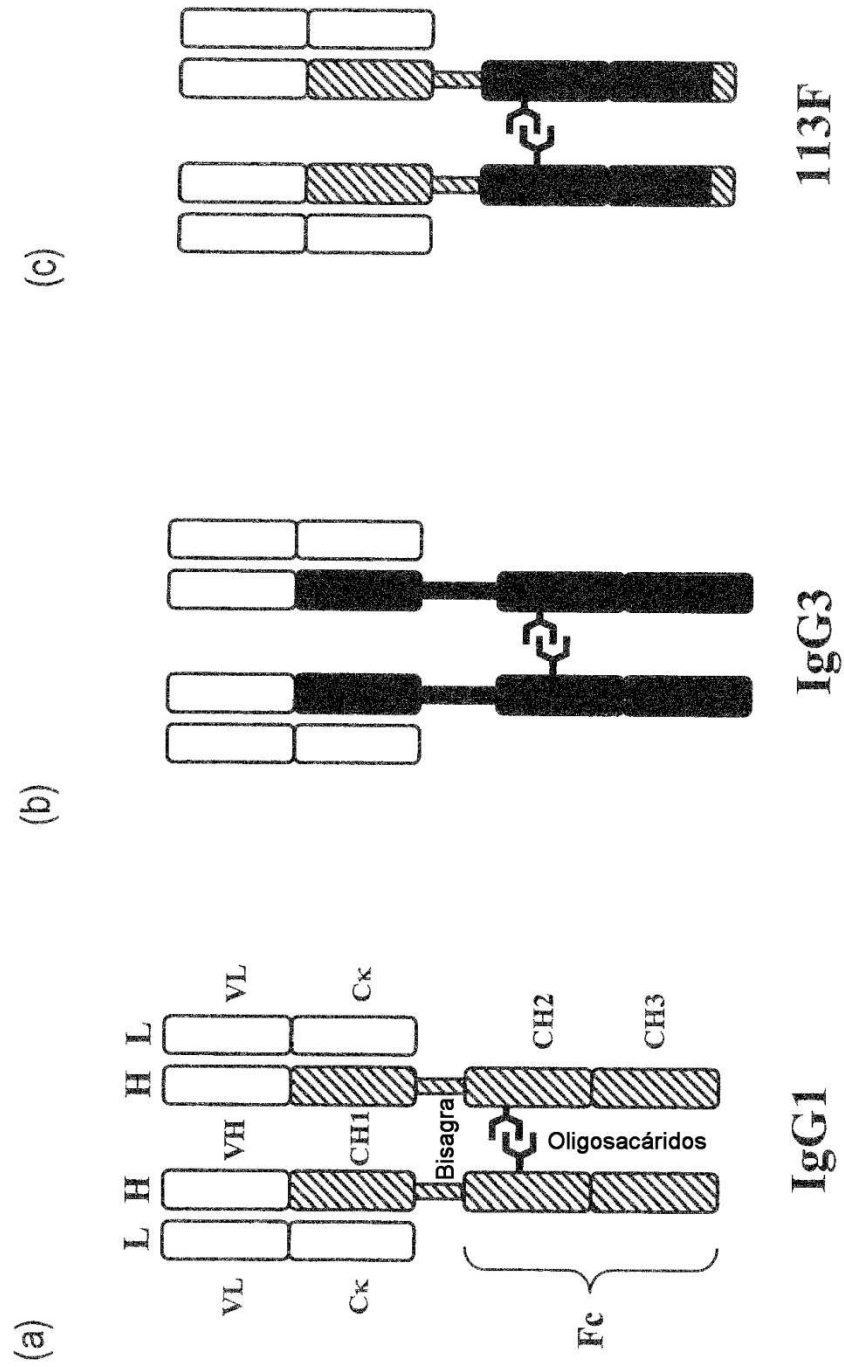


Fig. 3

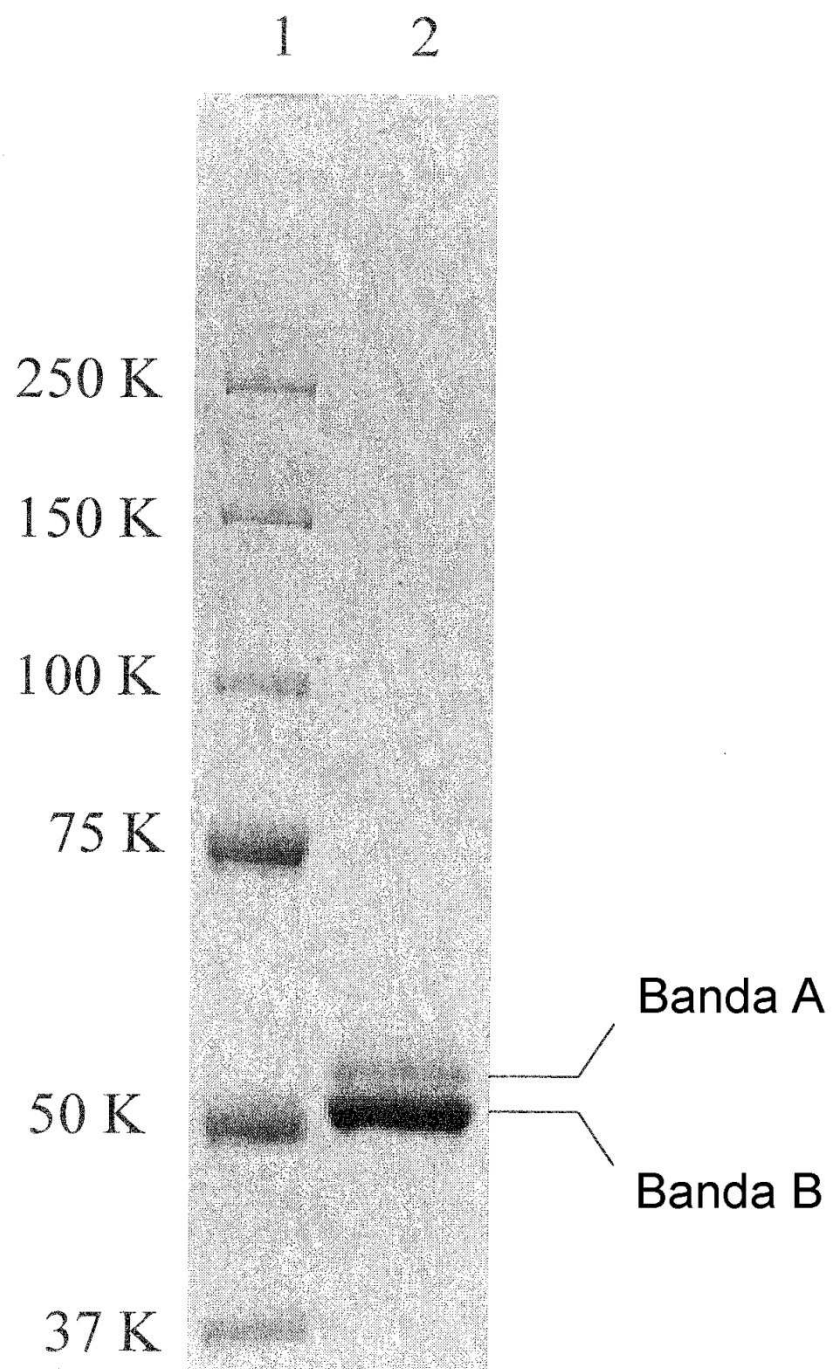


Fig. 4

	CH1							
	120	130	140	150	160	170		
IgG1	ASTKGPSVFPLAP SSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS							
IgG3	ASTKGPSVFPLAP CSR STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS							
113F	ASTKGPSVFPLAP SSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS							
	180	190	200	210	Bisagra			
				220				
IgG1	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY IC NVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT -----							
IgG3	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY TC NVNHKPSNTKVDK RVELKTP LGDTT HTCPRCPEPKSC							
113F	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY IC NVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT -----							
					CH2			
				230	240	250		
IgG1	-----CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT							
IgG3	DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT							
113F	-----CPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT							
	260	270	280	290	300	310		
IgG1	LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQ YN STYRVVSVLTVLH							
IgG3	LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFK WYVDGVEVHNAKTKPREEQ FN ST FR VVSVLTVLH							
113F	LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFK WYVDGVEVHNAKTKPREEQ FN ST FR VVSVLTVLH							
					CH3			
	320	330	340	350	360	370		
IgG1	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AK GQPREPQVYTLPPSR DEL TKNQVSLTCLVK							
IgG3	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK TK GQPREPQVYTLPPSR EEM TKNQVSLTCLVK							
113F	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK TK GQPREPQVYTLPPSR EEM TKNQVSLTCLVK							
	380	390	400	410	420	430		
IgG1	GFYPSDIAVEWES NG QPENNY K TT PV LDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN V FSCSVMHE							
IgG3	GFYPSDIAVEWES SS GQPENNY N TT P MLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN I FSCSVMHE							
113F	GFYPSDIAVEWES SS GQPENNY N TT P MLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN I FSCSVMHE							
					★★★★★			
	440							
IgG1	ALHN HY TQKSLSLSPGK							
IgG3	ALHN R FTQKSLSLSPGK							
113F	ALHN HY TQKSLSLSPGK							

Fig. 5

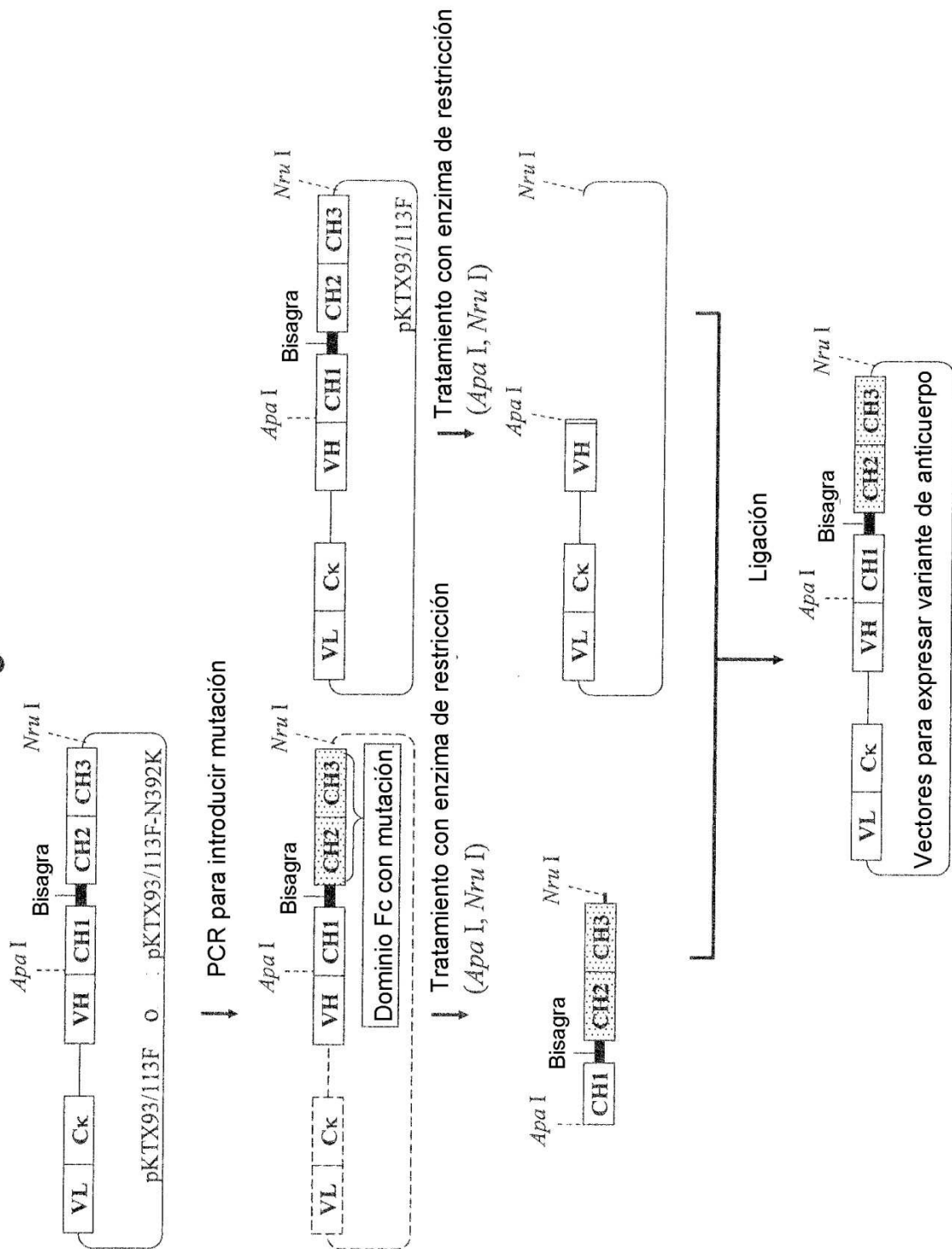


Fig. 6

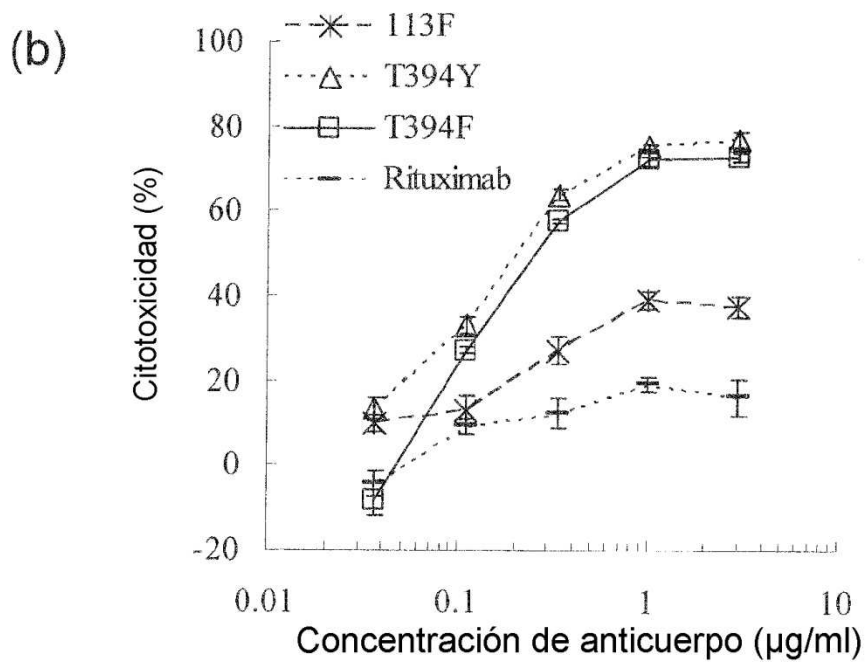
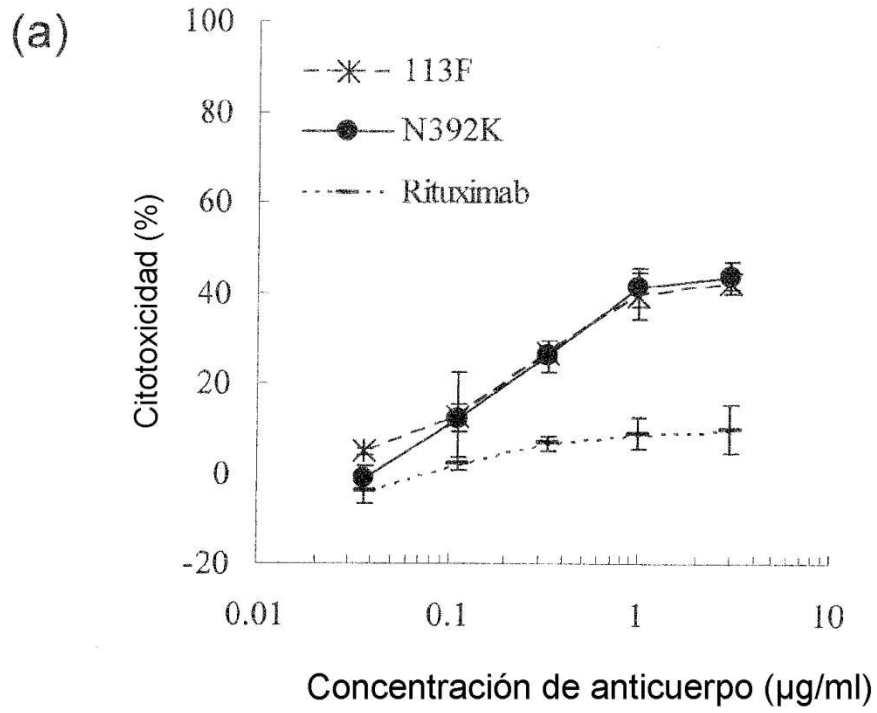


Fig. 7

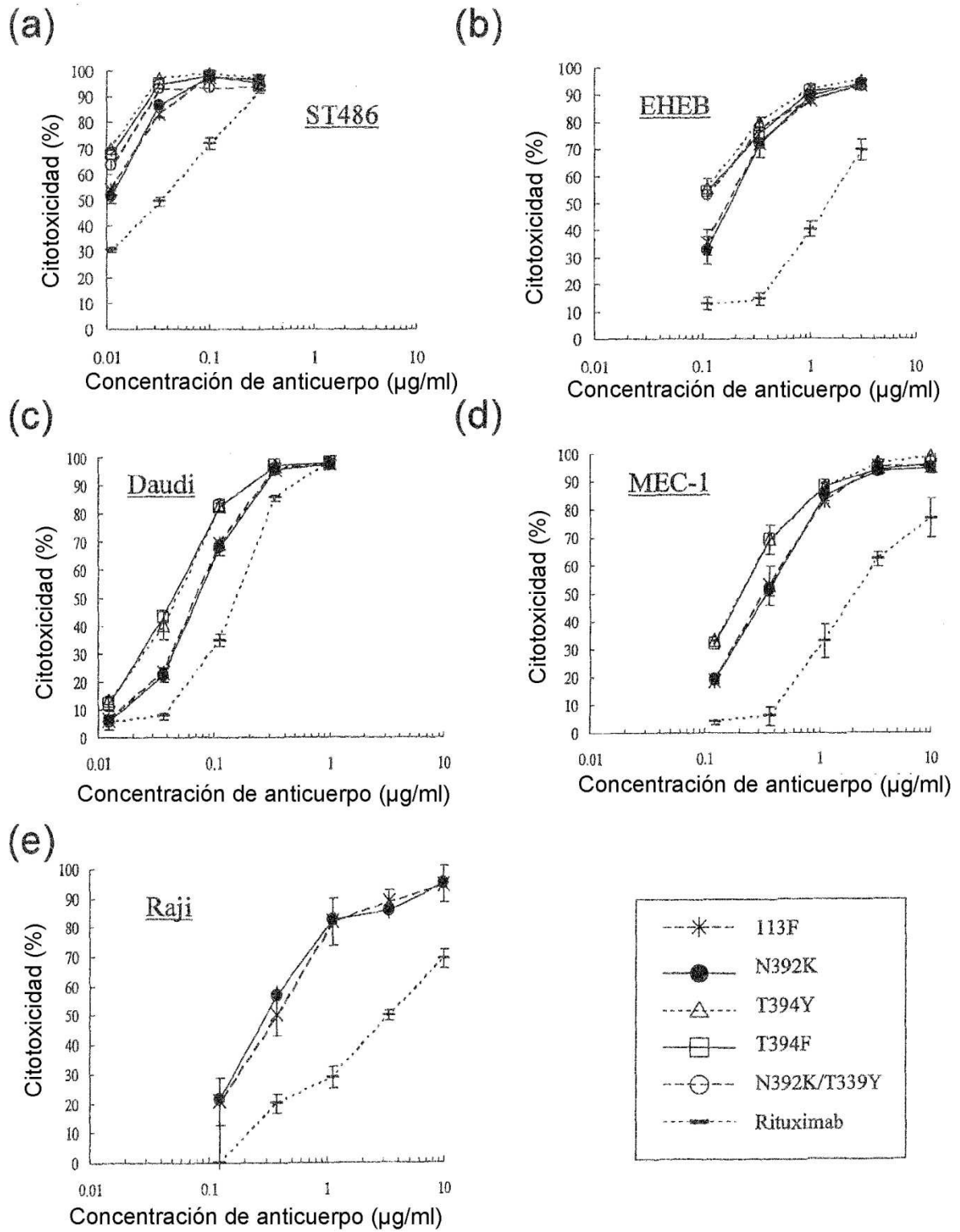


Fig. 8

