



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 964**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02773840 .0**
96 Fecha de presentación : **22.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1443961**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Composiciones de glicoproteína.**

30 Prioridad: **25.10.2001 US 337642 P**
09.01.2002 US 347694 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2009

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Presta, Leonard, G.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Composiciones de glicoproteína.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden glicoproteínas con patrones de glicosilación modificados. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden una glicoproteína con una región Fc, en la que aproximadamente el 80-100% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína.

Descripción de la técnica anterior

15 Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que muestran una especificidad de unión por un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante una enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de manera regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los dominios de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables se diferencian ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones de estructura (“framework”) (FR). Los dominios variables de las cadenas nativas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro FR, adoptando ampliamente una configuración de lámina β , conectada mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas de manera próxima mediante las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestra varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de éstos se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , β , ϵ , γ , y μ respectivamente. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, se sabe que sólo las IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas activan el complemento; y las IgG1 e IgG3 humanas mediante la ADCC de manera más eficaz que IgG2 e IgG4.

En la figura 1A se muestra una representación esquemática de la estructura de IgG1 nativa, donde se indican las diversas partes de la molécula de anticuerpo nativa. Las digestiones con papaína de anticuerpos producen dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. La estructura cristalina de la región Fc de IgG humana ha sido determinada (Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370 (1981)). En moléculas de IgG humana, la región Fc se genera mediante la división de N-terminal a Cys 226 por papaína. La región Fc es central a las funciones efectoras de los anticuerpos.

Se han descrito otras moléculas parecidas a anticuerpos. Por ejemplo, las “inmunoadhesinas” que combinan el dominio de unión de una proteína heteróloga, tal como un receptor, ligando o enzima, con las funciones efectoras de una región Fc se han descrito en la bibliografía. Un ejemplo de dicha molécula es la inmunoadhesina receptor del factor de necrosis tumoral-IgG (TNFR-IgG) descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.610.297. También se han descrito las inmunoadhesinas biespecíficas y las quimeras anticuerpo-inmunoadhesina. Stabila, P., Nature Biotech, 16: 1357 (1998) describe otra proteína de fusión anclada a la membrana plasmática que contiene la región Fc. La proteína de fusión en esta referencia combina un dominio transmembrana de tipo II que se localiza en la membrana plasmática, fusionada al extremo N-terminal de una región Fc.

Los anticuerpos e inmunoadhesinas se utilizan como agentes terapéuticos en enfermedades humanas (Glennie *et al.* Immunol. Today 21: 403-410 (2000); King *et al.* Curr. Opin. Drug Discovery Develop 2: 110-117 (1999); Vaswani *et al.* Ann. Allergy Asthma Immunol. 81: 105-119 (1998); y Abraham *et al.* Sec. Intern. Autumnal Them. Meeting on Sepsis, Deauville, France (1995)). Algunos de estos anticuerpos e inmunoadhesinas, por ejemplo aquellos que se unen a un receptor o ligando y, por tanto bloquean la interacción del ligado o receptor, pueden funcionar sin utilizar los mecanismos efectores del anticuerpo. Otros pueden necesitar reclutar el sistema inmune para matar la célula diana (Clynes *et al.* Nature Med. 6: 443-446 (2000); Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998); y Anderson *et al.* Biochem. Soc. Trans. 25: 705-708 (1997)).

Funciones efectoras del anticuerpo

Las funciones efectoras mediadas por la región Fc de anticuerpo se pueden dividir en dos categorías: (1) funciones efectoras que actúan después de la unión del anticuerpo al antígeno (estas funciones implican la participación de la cascada de complementos o células que portan el receptor de Fc(FcR); y (2) funciones efectoras que actúan independientemente de la unión a antígeno (estas funciones confieren persistencia en la circulación y la capacidad para ser transferidas a través de las barreras celulares mediante transcitosis). Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995).

Aunque la unión de un anticuerpo al antígeno requerido presenta un efecto neutralizante que podría evitar la unión de un antígeno extraño a su diana endógena (por ejemplo, receptor o ligando), la unión sola no puede eliminar el antígeno extraño. Para ser eficaz en la eliminación y/o destrucción de los antígenos extraños, un anticuerpo debe estar dotado con una afinidad elevada por su antígeno y funciones efectoras eficaces.

La interacción de anticuerpos y complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario produce una serie de respuestas, incluyendo la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (revisada en Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997); Ward and Ghetie, Therapeutic Immunol. 2: 77-94 (1995); así como Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)).

Varias funciones efectoras de anticuerpos están mediadas por receptores Fc (FcRs), que se unen a la región de un anticuerpo. Los FcRs se definen por su especificidad por los isotipos de inmunoglobulina; a los receptores Fc para anticuerpos IgG se les hace referencia como FcγR, para IgE como FcεR, para IgA como FcαR, etcétera. Se han identificado tres clases de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Debido a que cada subclase de FcγR es codificada por dos o tres genes, y el corte y empalme ("splicing") alternativo de ARN conduce a múltiples transcritos, existe una amplia diversidad de isoformas FcγR. Los tres genes que codifican la subclase FcγRI (FcγRIA, FcγRIB y FcγRIC) están agrupados en la región 1q21.1 del brazo largo del cromosoma 1; los genes que codifican las isoformas FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC) y los dos genes que codifican FcγRIII (FcγRIIIA y FcγRIIIB) están agrupados en la región 1q22. Estos subtipos diferentes de FcR se expresan sobre tipos de células diferentes (revisadas en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)). Por ejemplo, en humanos, FcγRIIIB se halla sólo en neutrófilos, mientras que FcγRIIIA se halla en macrófagos, monocitos, células asesinas (NK) naturales, y una subpoblación de células T.

Estructuralmente, los FcγR son todos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas que presentan una cadena α de unión a IgG con una parte extracelular comprendida por dos o tres dominios de tipo Ig (FcγRI y FcγRIII) o tres (FcγRII). Además, FcγRI y FcγRIII tienen cadenas de proteínas complementarias (γ,ζ) asociadas con la cadena α que actúan en la transducción de la señal. Los receptores también se diferencian por su afinidad por IgG. El FcγRI muestra una afinidad elevada por IgG, $K_a = 10^8$ - 10^9 M⁻¹ (Ravetch *et al.* Ann. Rev. Immunol. 19: 275-290 (2001)) y se puede unir a IgG monomérica. En cambio, FcγRII y FcγRIII muestran una afinidad relativamente débil por la IgG monomérica $K_a \leq 10^7$ M⁻¹ (Ravetch *et al.* Ann. Rev. Immunol. 19: 275-290 (2001)), y, por tanto, sólo interacciona de manera eficaz con complejos inmunes multiméricos. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que presentan secuencias de aminoácidos similares difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunoreceptor de base tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor de base tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase la revisión en Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Las células sólo transportan FcγRIIIA y la unión de anticuerpos a FcγRIIIA conduce a la actividad ADCC por células NK.

Se han encontrado variantes alélicas de varios de los FcγR humanos en la población humana. Se ha observado que estas formas de variantes alélicas muestran diferencias en la unión de IgG humana y murina y una serie de estudios de asociación han correlacionado los resultados clínicos con la presencia de formas alélicas específicas (revisada en Lehrbecher *et al.* Blood 94 (12): 4220-4232 (1999)). Se han investigado dos formas de FcγRIIA, R131 y H131, y su asociación con resultados clínicos (Hatta *et al.* Genes and Immunity 1: 53-60 (1999); Yap *et al.* Lupus 8: 305-310 (1999); y Lorenz *et al.* European J. Immunogenetics 22: 397-401 (1995)). Ahora sólo se están investigando dos formas alélicas de FcγRIIIA, F158 y V158, (Lehrbecher *et al.*, *supra*; y Wu *et al.* J. Clin. Invest. 100 (5): 1059-1070 (1997)). El alotipo FcγRIIIA (Val158) interacciona con IgG humana mejor que el alotipo FcγRIIIA (Phe158) (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Koene *et al.* Blood 90: 1109-1114 (1997); y Wu *et al.* J. Clin. Invest. 100: 1059-1070 (1997)).

Otro tipo de receptor de Fc es el receptor de Fc neonatal (FcRn). FcRn es estructuralmente similar al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y consiste en una cadena α unida de manera no covalente a macroglobulina β_2 . Se ha propuesto que FcRn regula la homeostasis de IgG en sangre, así como posiblemente controlar la transcitosis a través de tejidos (Ghetie *et al.* Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766 (2000)).

El sitio de unión en anticuerpos humanos y murinos para Fc γ R se han mapeado previamente en la denominada "región de bisagra interior" que consiste en los residuos 233-239 (índice EU que numera según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Woof *et al.* Molec. Immunol. 23: 319-330 (1986); Duncan *et al.* Nature 332: 563 (1988); Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173: 1483-1491 (1991); Chappel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 9036-9040 (1991). De los residuos 233-239, P238 y S239 se han citado como que están posiblemente implicados en la unión.

Otras áreas citadas previamente posiblemente implicadas en la unión a Fc γ R son: G316-K338 (IgG humana) para Fc γ RI humano (mediante sólo la comparación de secuencias; no se evaluaron mutantes de sustitución) (Woof *et al.* Molec. Immunol. 23: 319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 humana) para Fc γ RIII humano (basado en péptidos) (Sarmay *et al.* Molec. Immunol. 21: 43-51 (1984)); Y407-R416 (IgG humana) para Fc γ RIII humano (basado en péptidos) (Gergely *et al.* Biochem. Soc. Trans. 12: 739-743 (1984)); así como N297 y E318 (IgG2b murina) para Fc γ RII murino (Lund *et al.*, Molec. Immunol. 29: 53-59 (1992)). Véase también Armour *et al.* Eur. J. Immunol. 29: 2613-2624 (1999).

WO00/42072 (Presta) describe variantes de polipéptidos con una unión a FcRs mejorada o disminuida. Véase también Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).

C1q y dos proteasas de serina, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente del mecanismo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q es una molécula hexavalente con un peso molecular de aproximadamente 460.000 y una estructura parecida a un ramo tulipanes en el que seis "tallos" de colágeno están conectados a seis regiones de cabeza globulares. Burton y Woof, Advances in Immunol. 51: 1-84 (1992). Para activar la cascada de complemento, es necesario que C1q se una a por los menos dos moléculas de IgG1, IgG2, o IgG3 (el consenso es que IgG4 no activa el complemento), pero sólo una molécula de IgM, unida a la diana antigénica. Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995) en la página 80.

En base a los resultados de las modificaciones químicas y los estudios cristalográficos, Burton *et al.* Nature, 288: 338-344 (1980) propusieron que el sitio de unión para el subcomponente del complemento C1q en IgG implica las últimas dos hebras β (C-terminal) del dominio CH2. Burton posteriormente sugirió (Molec. Immunol., 22 (3): 161-206 (1985)) que la región que comprende los residuos de aminoácidos 318 a 337 podría estar implicada en la fijación del complemento.

Duncan y Winter Nature 332: 738-40 (1988), utilizando la mutagénesis dirigida, describió que Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión a C1q. Los datos de Duncan y Winter se generaron mediante el análisis de la unión de un isotipo IgG2b de ratón a C1q de cobaya. El papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys322 en la unión de C1q se confirmó por la capacidad de un péptido sintético corto que contenía estos residuos para inhibir la lisis mediada por complemento. Se describen resultados similares en la Patente de Estados Unidos No. No. 5.648.260 concedida el 15 de julio de 1997 y la Patente de Estados Unidos No. 5.624.821 concedida el 29 de abril de 1997.

El residuo Pro331 está implicado en la unión a C1q mediante el análisis de la capacidad de las subclases de IgG humana para llevar a cabo la lisis celular mediada por complemento. La mutación de Ser331 a Pro331 en IgG4 confirió la capacidad de activar el complemento (Tao *et al.*, J. Exp. Med., 178: 661-667 (1993); Brekke *et al.*, Eur. J. Immunol., 24: 2542-47 (1994)).

A partir de la comparación de los datos del grupo de Winter, y los artículos de Tao *et al.* y Brekke *et al.*, Ward y Ghetie concluyeron en su artículo de revisión que existen por los menos dos regiones diferentes implicadas en la unión de C1q: una en la hebra β del dominio CH2 que porta los residuos Glu318, Lys320 y Lys322, y la otra en una giro localizado próximo a la misma hebra β y que contiene un residuo de aminoácido clave en la posición 331.

Otros trabajos sugirieron que los residuos Lys235, y Gly237 de IgG1 humana localizados en la región bisagra inferior juegan un papel crítico en la fijación y activación del complemento. Xu *et al.*, J. Immunol. 150: 152A (Resumen) (1993). WO94/29351 publicada el 22 de diciembre de 1994 describe que los residuos de aminoácidos necesarios para la unión a C1q y FcR de la IgG1 humana se localizan en la región N-terminal del dominio CH2, es decir, los residuos 231 a 238.

Adicionalmente se ha propuesto que la capacidad de IgG para unirse a C1q y activar la cascada de complemento también depende de la presencia, ausencia o modificación del grupo carbohidrato situado entre los dos dominios CH2 (que está normalmente anclado en Asn297). Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995) en la página 81.

Las variantes de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y la capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos No. 6.194.551B1 y WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Otros métodos que mejoran el reclutamiento del sistema inmune incluyen anticuerpos biespecíficos, en los que un brazo del anticuerpo se une a un receptor de IgG (Segal *et al.* J. Immunol. Meth. 248: 1-6 (2001); y las proteínas de fusión citoquina-IgG (Penichet *et al.* J. Immunol. Meth. 248: 91-101 (2001)).

5 Glicosilación de anticuerpos

Muchos polipéptidos, incluyendo anticuerpos, se someten a una serie de modificaciones post-traduccionales que implican grupos carbohidrato, tales como glicosilación con oligosacáridos. A dichos polipéptidos glicosilados se les hace referencia como "glicoproteínas".

10

Existen diversos factores que pueden incluir en la glicosilación. Se ha observado que el tipo de especie, tejido y célula es importante en el modo en que tiene lugar la glicosilación. Además, el medio extracelular, a través de condiciones de cultivo alteradas, tales como la concentración en suero, pueden tener un efecto directo en el patrón de glicosilación. (Lifely *et al.* Glycobiology 5(8): 813-822 (1995)). Se han propuesto varios métodos para alterar el patrón de glicosilación conseguido en un organismo huésped particular, incluyendo la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patente de Estados Unidos No. 5.047.335; Patente de Estados Unidos No. 5.510.261). Estos esquemas no se limitan a métodos intracelulares (Patente de Estados Unidos No. 5.278.299).

15

20

Todos los anticuerpos contienen carbohidratos en las posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos unidos a N. Aparte del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta un 30% de las IgGs humanas presentan una región Fab glicosilada. La IgG presenta un carbohidrato con doble brazo unido a N en Asn297 del dominio CH2. La estructura de carbohidrato totalmente procesada unida al Asn297 se representa en la figura 2 de la presente invención. Para IgG de suero o producida *ex vivo* en hibridomas o células modificadas, las IgG son heterogéneas con respecto al carbohidrato unido a Asn297. Jefferis *et al.* Immunol. Rev. 163: 59-76 (1998); y Wright *et al.* Trends Biotech 15: 26-32 (1997). Para la IgG humana, el oligosacárido central consiste normalmente en GlcNAc₂Man₃GlcNAc, con números diferentes de residuos exteriores. La figura 2 de la presente invención representa el mecanismo de procesamiento del oligosacáridos en el carbohidrato maduro. La especie sintetizada previamente Glu₃Man₉GlcNAc₂ se transfiere a Asn297 en el dominio CH2 del anticuerpo a medida que sale del ribosoma. Después de recortar tres glucosas terminales a medida que la glicoproteína pasa por el retículo endoplasmático, la glicoproteína se mueve a golgi cis donde los residuos de manosa son eliminados enzimáticamente por α -manosidasas. El procesamiento puede detenerse en esta unión, produciendo glicoproteínas hipermanosiladas. De otro modo, el procesamiento puede continuar para producir Man₅GlcNAc₂. La acción de N-acetilglicosaminiltransferasa I en el Golgi medio es la etapa comprometedor en la síntesis de oligosacáridos complejos. En el golgi *medio* y *trans*, el oligosacárido experimenta etapas de procesamiento posteriores en los que los residuos de manosa se recortan y los residuos de azúcares se añaden secuencialmente. La glicoproteína recién sintetizada sale entonces del aparato de Golgi y se transporta a la membrana celular o es secretada.

25

30

35

40

La variación ente IgG individuales tiene lugar a través de la unión de galactosa y/o galactosa-ácido siálico en las dos GlcNAc terminales o a través de la unión de un tercer brazo de GlcNAc (GlcNAc bisectante). Se ha estudiado el carbohidrato unido a Asn297 de IgG. La ausencia del carbohidrato afecta en la unión a C1q y Fc γ R (y consecuentemente afecta a la activación del complemento y ADCC). Leatherbarrow *et al.* Molec. Immunol. 22: 407-415 (1985); Duncan *et al.* Nature 332: 738-740 (1988); Walker *et al.* Biochem. J. 259: 347-353 (1989); Dorai *et al.* Hybridoma 10: 211-217 (1990); y Horan Hand *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 35: 165-174 (1992). Aunque la unión a FcRn parece no estar afectada por la falta de carbohidrato (Hobbs *et al.* Molec. Immunol. 29: 949-956 (1992); y Kim *et al.* Eur. J. Immunol. 24: 542-548 (1994)), el efecto sobre la depuración es incierto (Dorai *et al.* Hybridoma 10: 211-217 (1990); Horan Hand *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 35: 165-174 (1992); Hobbs *et al.* Molec. Immunol. 29: 949-956 (1992); Kim *et al.* Eur. J. Immunol. 24: 542-548 (1994); Wawrzynczak *et al.* Biochem. Soc. Trans. 17: 1061-1062 (1989); y Tao *et al.* J. Immunol. 143: 2595-2601 (1989)). Cuando el carbohidrato está presente, la naturaleza de los residuos de azúcares también puede influir en las funciones efectoras de IgG. Se ha descrito que la presencia o ausencia de residuos de galactosa terminal afecta a la función (Wright *et al.* J. Immunol. 160: 3393-3402 (1998)) y parece estar correlacionado con la artritis reumatoide (Parekh *et al.* Nature 316: 452-457 (1985)). La IgG humana aislada del suero de los pacientes con mieloma múltiple muestra extremos en presencia/ausencia de fucosa, galactosa y N-acetilglicosamina bisectante (Parekh *et al.* Nature 316: 452-457 (1985)). Raju *et al.* describen la variación en la glicosilación de IgG de diferentes especies (Raju *et al.* Glycobiology 10 (5): 477-486 (2000)).

50

55

60

Boyd *et al.* hallaron que la eliminación de ácido siálico terminal de CAMPATH-1H derivado de CHO a través de la digestión con la glicopeptidasa F no realizó ninguna de las actividades de IgG analizadas, mientras que se observó que la eliminación de la mayoría de los residuos de galactosa de CAMPATH-1H desialilada reducía (pero no eliminaba) la actividad de lisis del complemento. Otras actividades no se vieron afectadas por la desgalactosilación. Boyd *et al.* Molec. Immunol. 32 (17/18): 1311-1318 (1995). Kumpel *et al.*, Hum. Antibod. Hybridomas, 5 (3-4): 143-151 (1994) describen que la galactosilación de anticuerpo monoclonal de IgG humana afecta a la actividad funcional mediada por el receptor de Fc.

65

Rothman *et al.* analizaron la función ADCC de IgG monoclonal purificada de hibridomas tratadas con inhibidores de glicosidasa que actuaron en diferentes etapas en el mecanismo de procesamiento de carbohidrato. Rothman *et al.* Molecular Immunol. 26 (12): 1113-1123 (1989). El tratamiento con castanoespermina, que inhibe la eliminación de residuos de glucosa del oligosacáridos naciente (Kaushal *et al.* Meth. Enzymol. 230: 316-329 (1994)), mostró una

ADCC aumentado por las células NK, que sólo expresan FcγRIII, pero no por otros tipos de células efectoras, tales como monocitos. El análisis de unión a lectina sugirió que la IgG tratada con castanoespermina carecía de fucosa, aunque, la IgG resultante del tratamiento con castanoespermina puede haber tenido otra estructura de carbohidrato, tal como hipermanosilación, así como residuos de glucosa terminales (Kaushal *et al.* Meth. Enzymol. 230: 316-329 (1994); Hashim *et al.* Immunology 63: 383-388 (1988); Hashim *et al.* Molec. Immunol. 24: 1087-1096 (1987)), no hallados habitualmente en IgG secretada de células no tratadas o de suero humano.

WO 97/30087 describe la preparación de anticuerpos glicosilados donde un punto de N-glicosilación del dominio Fc del anticuerpo es sustituido por un oligosacárido con dos brazos.

Umana *et al.* introdujeron un gen de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GcTIII) que cataliza la adición de una GlcNAc bisectada al centro del carbohidrato unido a Asn297 del anticuerpo en células de ovario de hámster chino (CHO). Se consideró que las glicoformas producidas por las células CHO modificadas tenían una ADCC optimizada. Véase WO 99/54342 y Umana *et al.*, Nature Biotechnology, 17: 176-180 (1999).

WO98/58964 (Raju *et al.*) describe composiciones de anticuerpos en las que sustancialmente todos los oligosacáridos unidos a N son un oligosacárido G2. G2 se refiere a una estructura con doble brazo con dos terminales Gals y ninguna NeuAcs. WO99/22764 (Raju *et al.*) se refiere a composiciones de anticuerpos que están sustancialmente libres de una glicoproteína con un oligosacárido G1, G0 o G-1 unido a N en su dominio CH2. g1 se refiere a una estructura con doble brazo que tiene una Gal y ninguna NeuAcs, G0 se refiere a una estructura con doble brazo en la que no están presentes ninguna NeuAcs o Gals terminales y G-1 se refiere a la unidad central menos una GlcNAc.

WO00/61739 describe que el 47% de los anticuerpos anti-hIL-5R expresados por células YB2/0 (mieloma de rata) presentan cadenas de azúcares unidas a α1-6 fucosa, en comparación con el 7% de los anticuerpos expresados por células NSO (mieloma de ratón). La proporción relativa de fucosa de anticuerpos α-hIL-5R expresados por varias células huésped fue YB2/0 < CHO/d < NSO.

Routier *et al.* estudiaron el patrón de glicosilación de un anticuerpo de IgG1 humanizado (D1.3) expresado en células CHO-DUKX. Las estructuras de los N-glicanos de las expresadas por CHO eran N-glicanos con dos brazos con una fucosa central pero carente de GlcNAc bisectante y ácido siálico. Las estructuras eran heterogéneas con respecto a la galactosilación terminal y, por tanto, se denominaron G1, G1, y G0. Routier *et al.* Glycoconjugate J. 14: 201-207 (1997).

Se ha descrito previamente que se ha observado la fucosa unida a O en una serie de polipéptidos y que la fucosa unida es importante para la correcta actividad del polipéptido. Véase WO98/33924, que describe métodos de glicosilación con un grupo de fucosa unido a O. Stankova *et al.* J. Immunol. 135 (6): 3719-3728 (1985) encontraron que la fucosa aumenta significativamente la capacidad citolítica de células efectoras inducidas o preincubadas por un cultivo mixto de leucocitos (MCL). Cameron *et al.* Immunol. Lett. 11: 39-44 (1985) hallaron que α-L-fucosa parece jugar un papel importante en las interacciones macrófago-células tumorales.

Existe una continua necesidad en la técnica para producir glicoproteínas, tales como anticuerpos, que presenten actividad biológica mejorada.

Mimura *et al.* (Molecular Immunology 37: 697-706 Agosto 2000) describieron tratamientos enzimáticos de un fragmento Fc glicosilado de IgG1-Wid aislado de suero de mieloma y una cadena pesada L243 de IgG1 de anticuerpo anti-MHC de clase II, para producir glicoformas truncadas. Se estudiaron las propiedades de las glicoformas truncadas para examinar la influencia de la glicosilación en la estabilidad termal y la función efectora de IgG1-Fc humana. Los autores describieron que los oligosacáridos truncados conferían un grado de actividad funcional y estabilidad termodinámica a la IgG1-Fc en comparación con la IgG1-Fc desglucosilada.

Kojima *et al.* (J. Biol. Chem. 271: 19457-19463 Agosto 1996) describieron la caracterización de la enzima STX de ratón como una ácido polisialílico sintasa que polisialila NCAM. El estudio utilizó una fusión de NCAM con Fc de IgG1 humana como un sustrato de enzima. Cuando se trató con fucosidasa, se redujo la polisialilación del sustrato por STX, indicando que la fucosa es necesaria para la polisialilación por STX.

Ohyama *et al.* (J. Biol. Chem. 273: 14582-14587 1998) describieron la clonación del gen GDP-d-manosa-4,6-deshidratasa (GMD), que genera GDP-manosa-4-ceto-6-D-desoximanosa a partir de GDP manosa, que posteriormente se convierte en GDP-L-fucosa. La enzima GMD es anormal en células CHO Lec13 que producen glicoproteínas deficientes en fucosilación. Se discutieron los posibles papeles para las glicoproteínas fucosiladas en la adhesión y tráfico de leucocitos.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de glicoproteínas, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Aquí se describen composiciones de glicoproteínas de una glicoproteína que presenta una región Fc, en la que aproximadamente 80-100% (y preferiblemente aproximadamente 90-99%) de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína. Se demostró en la presente que dichas composiciones mostraba sorprendentemente una mejora de 100 veces en la unión

a Fc(RIIIA(F158), que no es tan eficaz como Fc(RIIIA(V158) en la interacción con IgG humana. De este modo, se anticipa que las composiciones de la presente invención son superiores a las composiciones descritas previamente, especialmente para la terapia de pacientes humanos que expresan Fc(RIIIA(F158). Fc(RIIIA (F158) es más habitual que Fc(RIIIA(V158) en africanos, americanos y caucásicos sanos normales. Véase Lehrnbecher *et al.* Blood 94: 4220 (1999).

La presente solicitud demuestra además el aumento sinérgico en la unión a FcγRIII y/o la función ADCC que resulta de la combinación de las variaciones de glicosilación aquí con la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos en la región Fc de la glicoproteína. Con el fin de generar la variante de la secuencia de aminoácidos de la región Fc con una mejor actividad ADCC, se modificará generalmente una variante de región Fc con afinidad de unión mejorada por FcγRIII, que se cree que es un FcR importante para mediar ADCC. Por ejemplo, se puede introducir una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en la región Fc parental en cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 ó 430 para generar dicha variante. La variante con una afinidad de unión mejorada por FcγRIII puede tener además una afinidad de unión reducida por FcγRII, especialmente una afinidad reducida por el receptor FcγRIIB inhibidor. En las realizaciones preferidas, la región Fc tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones 298, 333 y 334, por ejemplo, S298A/E333A/K334A. La región de Fc con una secuencia de aminoácidos alterada comprende además una variación de glicosilación que además aumenta ADCC. Por ejemplo, la región Fc variante puede tener unido a la misma una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa.

De este modo, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína que tiene una región Fc, en la que aproximadamente el 51-100% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína, y donde la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia nativa. Más preferiblemente, aproximadamente 80-100% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa y más preferiblemente aproximadamente 90-99% de la glicoproteína en la composición carece de fucosa unida a la estructura de carbohidrato central madura

La glicoproteína puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo o una inmunoadhesina. La glicoproteína comprende generalmente una región Fc, preferiblemente una región Fc humana; por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. La glicoproteína muestra una mayor unión a una FcγRIII (tal como FcγRIIA (F158) y/o FcγRIIA (V158)) y una mejor ADCC en relación con la glicoproteína con fucosa unida a su estructura de carbohidrato central madura.

La presente invención también proporciona una preparación farmacéutica que comprende la glicoproteína y, opcionalmente, un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esta preparación para el potencial uso terapéutico es estéril y se puede liofilizar.

Se contemplan los usos diagnóstico y terapéutico para la glicoproteína descritos en la presente invención. Una aplicación diagnóstica es un método para determinar la presencia de un antígeno de interés que comprende exponer una muestra sospechosa de contener el antígeno a la glicoproteína y determinar la unión de la glicoproteína a la muestra.

Una aplicación terapéutica es un método de tratamiento de un mamífero que padece o está predispuesto a una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de dicho tratamiento, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención, especialmente cuando la composición es una preparación farmacéutica.

La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica una glicoproteína que comprende una región Fc, según las reivindicaciones adjuntas. Además, la presente invención proporciona un método para producir una glicoproteína que comprende cultivar esta célula huésped, de manera que se expresa el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar la glicoproteína del cultivo de célula huésped (por ejemplo, del medio de cultivo de célula huésped).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una representación esquemática de una IgG nativa y la digestión enzimática de la misma para generar varios fragmentos de anticuerpos. Los puentes disulfuro se representan por líneas dobles entre los dominios CH1 y CL y los dos dominios CH2. V es dominio variable; c es dominio constante; L representa cadena ligera y H representa cadena pesada. La Figura 1B representa esquemáticamente una estructura de carbohidrato central totalmente procesada o "madura" (2100) unida a Asn297 de IgGs de suero, la estructura de carbohidrato central madura con un único residuo de galactosa (2210), así como la estructura de carbohidrato central con dos residuos de galactosa y una GlcNAc bisectante (3120). El número de residuos GlcNAc, fucosa, galactosa y ácido siálico, respectivamente, se reflejan con los sistemas de numeración de cuatro dígitos mostrados en esta figura.

La Figura 2 ilustra la adición de oligosacárido a Asn297 en el dominio CH2 de la IgG, seguido del procesado del mismo en el aparato de Golgi cis, medio y trans para generar la estructura de carbohidrato totalmente procesada compleja con dos brazos. Las castanoespermina inhibe la eliminación de residuos de glucosa y manosa del oligosacáridos naciente.

ES 2 326 964 T3

La Figura 3 muestra oligosacáridos de cadena pesada (Fc) hallados en anticuerpos expresados en células CHO con metabolismo de fucosa normal.

A lo largo de la leyenda de la figura adicional y los Ejemplos, se utilizan las siguientes designaciones: “Hu4D5” es una abreviatura para el anticuerpo 4D5 anti-HER2 humanizado, ovario de hámster chino se abrevia como “CHO”, las células CHO-DP12 cultivadas en placas de 15 cm se designan “CHO-P”, células CHO-DP12 cultivadas en matraces de agitación se designan como “CHO-S”, células 293 de riñón embrionario humano se abrevian como “HEK293”, “Lec 13” representa la línea celular CHO con un metabolismo defectuoso de fucosa obtenida de Pamela Stanley del Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, New York, Hu4D5 con sustituciones S298A/E333A/K334A en la región Fc del mismo se denomina “Hu4D5-AAA”, “E27” es el anticuerpo anti-IgE maduro por afinidad/humanizado descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6.172.213, E27 con las sustituciones S298A/E333A/K334A en la región Fc del mismo se designa como “E27-AAA”, y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos de células mononucleares de sangre periférica “PBMC ADCC”.

La Figura 4 muestra la unión de monómeros de Hu4D5 a FcγRI humano. El anticuerpo Hu4D5 se expresó en células CHO-S, HEK293, CHO-P, o CHO Lec13 (dos lotes diferentes).

La Figura 5 muestra la unión de dímeros de Hu4D5 a FcγRIIB humano. El anticuerpo Hu4D5 se expresó en células CHO-S o Lec13 (tres lotes diferentes).

La Figura 6 muestra la unión de dímeros Hu4D5 a FcγRIIA (R131) humano. El anticuerpo Hu4D5 se expresó en células CHO o células Lec13 (tres lotes diferentes).

La figura 7 ilustra la unión de dímero Hu4D5 a FcγRIIA(H131). El anticuerpo Hu4D5 se expresó en células CHOS o Lec13 (tres lotes diferentes).

La Figura 8 muestra la unión de dímeros Hu4D5 o Hu4D5-AAA expresados en células CHO-S o Lec13 (tres y dos lotes diferentes, respectivamente), a FcγRIIA(V158) humano.

La Figura 9 revela la unión de dímeros Hu4D5 expresados en células CHO-S o Lec13 (tres lotes diferentes) o dímeros Hu4D5-AAA expresados en células Lec13 (dos lotes diferentes) a FcγRIIA(F158) humano.

La Figura 10 representa la unión de dímeros anti-IgE (E27) a FcγRIIA(V158). En este ensayo se analizó E27 expresado en células HEK293, células CHOP (dos lotes) o células Lec13 (dos lotes).

La Figura 11 representa la unión de dímeros anti-IgE (E27) a FcγRIIA (F158) humano. En este ensayo se analizó E27 expresado en células HEK293, células CHOP (dos lotes) o células Lec13 (dos lotes).

La Figura 12 ilustra la unión de anti-IgE (E27) y E27-AAA a FcγRIIA(F158). Los anticuerpos se expresaron en células CHO-P, Lec13 o HEK293.

La Figura 13 ilustra la unión de hexámeros anti-IgE (E27) y E27-AAA a FcγRIIA(V158). Los anticuerpos se expresaron en células CHO-P, Lec13 o HEK293.

La Figura 14 representa la unión de Hu4D5 expresado en células CHO-P, CHO-S o Lec13 a FcRn humano.

La Figura 15 representa la unión de Hu4D5 y anti-CD20 (RITUXAN®) a C1q humano. Hu4D5 se expresó en células CHO-P o Lec13 (dos lotes). RITUXAN® se expresó en células CHO-P.

La Figura 16 representa la unión de Hu4D5 o RITUXAN® a C1q humano. Hu4D5 utilizado en este experimento se expresó en células CHO-P, Lec13 (tres lotes diferentes) o CHO-S. RITUXAN® se expresó en células CHO-P.

La Figura 17 representa la ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1) utilizando un dador FcγRIII VF. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13.

La Figura 18 representa la ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1) utilizando otro dador FcγRIII VF. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13.

La Figura 19 representa la ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1) utilizando un dador FcγRIII FF. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13.

La Figura 20 representa la ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1) utilizando otro dador FcγRIII FF. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13.

ES 2 326 964 T3

La Figura 21 representa la ADCC de monocitos en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 10:1) utilizando un dador Fc γ RIIA RR. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13 (dos lotes diferentes).

5 La Figura 22 representa la ADCC de monocitos en células tumorales de mama SKBR3 E:T 10:1) utilizando un dador Fc γ RIIA HH. Se muestra la ADCC espontánea en comparación con la resultante de Hu4D5 expresado en células CHO-S o Lec13.

10 La Figura 23 representa las alineaciones de regiones Fc de IgG de secuencia nativa. Se muestran Las secuencias de Fc de IgG humanas de secuencia nativa, humIgG1 (alotipos no-A y A) (SEC ID NOs: 1 y 2, respectivamente), humIgG2 (SEC ID NO: 3), humIgG3 (SEC ID NO: 4) y humIgG4 (SEC ID NO: 5). La secuencia de IgG1 humana es el alotipo no-A, y las diferencias ente esta secuencia y el alotipo A (en las posiciones 356 y 358; sistema de numeración EU) se muestra bajo la secuencia de IgG1 humana. También se muestran las secuencias de la región de Fc de IgG murina de secuencia nativa, murIgG1 (SEC ID NO: 6), murIgG2A (SEC ID NO: 7), murIgG2B (SEC ID NO: 8) y murIgG3 (SEC ID NO: 9).

20 La Figura 24 representa la unión de Hu4D5 y Hu4D5-AAA a células asesinas naturales (NK) positivas de CD56. Los productos analizados fueron: (1) IgG anti-humano conjugado a FITC, (2) Hu4D5 de CHO-S, (3) Hu4D5 expresado en células Lec 13, y (4) Hu4D5-AAA expresado en células Lec 13.

La Figura 25 revela la tinción por inmunofluorescencia de células NK purificadas que expresan receptores Fc γ RIII (F/F).

25 La Figura 26 proporciona una comparación de la actividad ADDC en NK de Hu4D5 procedente de células CHO-S, Hu4D5 procedente de células Lec13, Hu4D5-AAA procedente de células Lec 13, y Hu4D5 procedente de células HEK293. El dador fue Fc γ RIII (F/F).

La Figura 27 repite el experimento de la Figura 26 con un dador Fc γ RIII (F/F) diferente.

30 La Figura 28 representa la unión de monómeros Hu4D5 anti-HER2 a la línea celular de CHO transfectada de manera estable con la cadena α y la cadena γ de Fc γ RIIIA humano (representación representativa para un ensayo). Hu4D5 CHO-S, círculos blancos; Hu4D5 Lec13-D, cuadrados blancos; Hu4D5 Lec13-E, diamantes blancos; Hu4D5 Lec13-F, triángulos blancos; Hu4D5 HEK293-AAA, círculos negros; Hu4D5 Lec13-AAA-B, cuadrados negros; Hu4D5 Lec13-AAA-C, diamantes negros.

35 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

40 A lo largo de la presente memoria y reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), incorporado expresamente aquí por referencia. El “índice de EU como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana.

45 Los grupos de carbohidrato de la presente invención se describirán en referencia a la nomenclatura más utilizada normalmente para la descripción de oligosacáridos. En Hubbard *et al.* Ann. Rev. Biochem. 50: 555-583 (1981) se encuentra una revisión de la química de carbohidratos que utiliza esta nomenclatura. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; G1cNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal, que representa galactosa; 50 Fuc para fucosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la notación acortada de NeuNAc, para ácido 5-N-acetilneuramínico y NeuNGc para 5-glicolneuramínico.

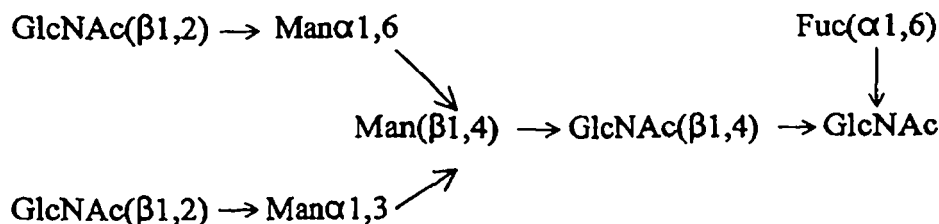
55 El término “glicosilación” significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos juntos, por ejemplo, de dos a aproximadamente doce azúcares simples unidos juntos) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de los oligosacáridos están unidas habitualmente al esqueleto de la glicoproteína a través de las uniones a N u O. Los oligosacáridos de la presente invención aparecen generalmente unidos a un dominio CH2 de una región Fc como oligosacáridos unidos a N.

60 “Glicosilación por unión a N” se refiere a la unión del grupo carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El experto en la materia reconocerá que, por ejemplo, cada uno de los dominios CH2 de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2 murinos, así como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e Ig2 humanos tienen un sitio para a glicosilación por unión a N en el residuo de aminoácido 297 (Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

65 “Glicoproteínas” son polipéptidos que presentan una o más cadenas laterales de oligosacáridos unidos a los mismos.

Para los objetivos de la presente invención, “una estructura de carbohidrato central madura” se refiere a una estructura de carbohidrato central procesada unida a una región Fc que consiste generalmente en la siguiente estructura

de carbohidrato GlcNAc(Fucosa)-Glc-Nac-Man-(Man-GLcNAc)₂ habitual de oligosacáridos con dos bifurcaciones representados de manera esquemática a continuación:



Este término incluye específicamente formas G-1 de la estructura de carbohidrato central madura que carece de un residuo β 1,2 GlcNAc. Preferiblemente, sin embargo, la estructura de carbohidrato central incluye ambos residuos de β 1,2 GlcNAc. La estructura de carbohidrato central madura aquí generalmente no está hipermanosilada.

La estructura de carbohidrato central madura se une a la región Fc de la glicoproteína, generalmente a través de la unión por N a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc.

Una “GlcNAc bisectante” es un residuo de GlcNAc unido a la β 1,4 manosa de la estructura de carbohidrato central madura. La GlcNAc bisectante se puede unir enzimáticamente a la estructura de carbohidrato central madura mediante una enzima β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). Las células CHO no expresan normalmente GnTIII (Stanley *et al.* J. Biol. Chem. 261: 13370-13378 (1984)), pero se pueden manipular para que lo hagan (Umana *et al.* Nature Biotech. 17: 176-180 (1999)).

Una glicoproteína que está “esencialmente libre” de uno o más grupos de azúcares seleccionados (por ejemplo, GlcNAc bisectante, uno o más residuos de galactosa, o uno o más residuos de ácido siálico) se produce generalmente en una célula huésped que es defectuosa en la adición del grupo o grupos de azúcares seleccionados a la estructura de carbohidrato central madura, de manera que aproximadamente el 90-100% de la glicoproteína en una composición carecerá del grupo o grupos de azúcares seleccionados unidos a la estructura de carbohidrato central madura.

Una “glicosidasa” es una enzima implicada en la biosíntesis de glicoproteínas unidas a asparagina (unidas por N). Una enzima de “recorte” es aquel que elimina uno o más oligosacáridos, mientras que una “transferasa” añade uno o más oligosacáridos. Ejemplos de glucosidasas incluyen glucosidasas de recorte, tales como glucosidasa I y glucosidasa II; manosidasas de recorte, tales como manosidasa de retículo endoplasmático rugoso (rER manosidasa), manosidasa IA, manosidasa IB y manosidasa II; así como transferasas, tales como glicosil transferasa, por ejemplo, β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), Gal-transferasas, ácido siálico transferasas y fuc-transferasas.

Un inhibidor de glicosidasas” se refiere a un compuesto o composición que reduce o evita el procesamiento de oligosacáridos unidos por N por una o más glicosidasas. Entre los ejemplos se incluyen, nojirimicina, 1-desoxinojirimicina (dMM), N-metil-1-desoxi-nojirimicina (M-dNM), castanoespermina, bromoconduritól, 1-desoximanojirimicina (dMM), australina, MDL, lentiginosina y Swainsonina (Sw). Los inhibidores de glicosidasas se revisan en Fuhrmann *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 825: 95-110 (1985); Kaushal y Elbein, *Methods in Enzym.* 230: 316-329 (1994); y Elbein, A. *FASEB J.* 3055-3063 (1991).

“Lec13” se refiere a la línea de células mutantes de Ovario de Hámster Chino (CHO) resistente a lectinas que muestra un metabolismo de la fucosa defectuoso y, por tanto, una menor capacidad para añadir fucosa a carbohidratos complejos. La línea celular se describe en Ripka y Stanley, *Somatic Cell & Molec. Gen.* 12 (1):51-62 (1986); y Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (2): 533-545 (1986) y está disponible en Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, Nueva York. Se cree que las células Lec13 carecen del transcrito para GDP-D-manosa-4,6-deshidratasa, una enzima clave para el metabolismo de fucosa. Ohyama *et al.* *J. Biol. Chem.* 273 (23):14582-14587 (1988). La GDP-D-manosa-4,6-deshidratasa genera GDP-manosa-4-ceto-6-D-desoximanosa a partir de GDP-manosa, que a continuación se convierte mediante la proteína FX a GDP-L-fucosa. La expresión de oligosacáridos fucosilados depende de los sustratos dadores de GDP-L-fucosa y fucosiltransferasa o fucosiltransferasas.

Una “fucosiltransferasa” es una enzima que añade una o más mucosas a una glicoproteína. Entre los ejemplos se incluyen α 1,6-fucosiltransferasa, FucTI, FucTII, FucTIII, FucTIV, FucTV, FucTVI y FucTVII. Las α 1,6-fucosiltransferasas porcinas y humanas se describen en Uozumi *et al.* J. Biol. Chem. 271: 27810-27817 (1996), y Yanagidani *et al.* J. Biochem. 121: 626-632 (1997), respectivamente.

Una “sialiltransferasa” es una enzima que añade uno o más residuos de ácido siálico a una glicoproteína. Una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa puede añadir un residuo o residuos de ácido siálico a un residuo o residuos de galactosa unidos a una estructura de carbohidrato central madura.

Una “galactotransferasa” es una enzima que añade uno o más residuos de galactosa a una glicoproteína. Una β 1,4-galactosiltransferasa puede añadir un residuo o residuos de galactosa unidos a la estructura de carbohidrato central madura.

El término “glicoproteína que contiene una región Fc” se refiere a una glicoproteína, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una región Fc.

El término “región Fc” se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1A. La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia nativa o una variante de la región Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por el tramo desde el residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo del mismo. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, CH2 y CH3, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 1A.

Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Entre las “funciones efectoras” de ejemplo se incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis; subregulación de los receptores de superficie de la célula (por ejemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos, por ejemplo, tal como se describen en la presente invención.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa se muestran en la figura 23 e incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de las mismas. Las regiones Fc murinas de secuencia nativa también se muestran en la figura 23. Otros ejemplos de regiones Fc de secuencia nativa incluyen la región Fc de IgA humana de secuencia nativa y la región Fc de IgG humana de secuencia nativa.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en por los menos una “modificación de aminoácidos” tal como se define en la presente invención. Preferiblemente la región Fc variante presenta por lo menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferiblemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de la presente invención poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferible por lo menos aproximadamente un 90% de homología con las mismas, más preferible por lo menos aproximadamente un 95% de homología con las mismas.

“Homología” se define como el porcentaje de residuos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir los espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología. Los métodos y programas informáticos para la alineación con bien conocidos en la técnica. Uno de dichos programas informáticos es “Align2”, autorizados por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en la Unites Stated Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de manera alternativa de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que presentan secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación inmunoreceptor de base tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición inmunoreceptor de base tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase la revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los receptores de Fc de la presente invención incluyen los dos alotipos naturales conocidos, FcγRII(H131) y FcγRII(R131), de FcγRII humano que están determinados por el aminoácido en la posición 131 (Clark *et al.* J. Immunol. 143: 1731-1734 (1989)), y los alotipos naturales de FcγRIIIA humano. El FcγRIIIA humano tiene alotipos naturales en la posición 48 (Leu, His o Arg) y en la posición 158 (Val o Phe). El alotipo FcγRIIIA(V158) interacciona con IgG humana mejor que el alotipo FcγRIIIA(F158) (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Koene *et al.* Blood 90: 1109-1114 (1997); y Wu *et al.* J. Clin. Invest. 100: 1059-1070 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos a identificar en el futuro, están comprendidos por el término “FcR” de la presente invención. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternos al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)).

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcRs (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las PBMCs y células NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMCs.

“Región bisagra” se define en general como el tramo desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 mediante la colocación del primer y el último residuo de cisteína que forman los enlaces S-S de la entre la cadena pesada en las mismas posiciones.

La “región bisagra inferior” es una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C-terminal a la región bisagra, es decir, residuos 233 a 239 de la región Fc.

El “dominio CH2” de la presente invención se utiliza aquí para describir un dominio CH2 que presenta un sitio de unión para por lo menos un oligosacárido por unión a N, generalmente en Asn297. Es característico de la glicoproteína de la presente invención que contenga o se modifique para que contenga por lo menos un dominio CH2 que tiene un oligosacárido unido por N de un dominio CH2 de IgG humano. El dominio CH2 es preferiblemente el dominio CHγ2 de IgG1 humana. Un dominio CH2 de IgG humano se extiende normalmente desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340 de la región Fc, utilizando el índice EU para la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina.

El “dominio CH3” comprende el tramo de residuos C-terminal hasta un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 447 de una IgG).

Los términos “aminoácidos” y “aminoácido” se refieren a todos los alfa aminoácidos naturales en sus formas estereoisoméricas L y D, y sus análogos y derivados. Un análogo se define como una sustitución de un átomo en el aminoácido por un átomo diferente que normalmente tiene propiedades similares. Un derivado se define como un aminoácido que tiene otra molécula o átomo unido al mismo. Los derivados incluirían, por ejemplo, la acetilación de un grupo amino, la aminación de un grupo carboxilo, o la oxidación de los residuos de azufre de dos moléculas de cisteína para formar cisteína.

Tal como se utiliza en la presente invención, “polipéptido” se refiere generalmente a péptidos y proteínas que presentan más de aproximadamente diez aminoácidos. Los polipéptidos pueden ser homólogos a una célula huésped en las que se expresan, o preferiblemente, pueden ser exógenos, entendiendo que son heterólogos, es decir, extraños a la célula huésped que se utiliza, tales como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano producido por una célula CHO.

El término “anticuerpo” Se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

“Fragmentos de anticuerpos”, tal como se define para el objetivo de la presente invención, comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente incluyendo la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multispecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que incluyen normalmente anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante antigénico. El calificativo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere un procedimiento particular para su producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención, pueden obtenerse por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse, por ejemplo, de bibliotecas de anticuerpos en fagos según las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 [1991] y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales descritos aquí, específicamente incluyen anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos

derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de estos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, los murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. La mayor parte de los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de Fv de la región estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o habitualmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos de las regiones de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2; 593-596 (1992).

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos tal como se describe en la presente invención. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esta biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Sheets *et al.* PNAS (USA) 95: 6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los anticuerpos humanos también se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o totalmente. Después de la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en humanos en todos sus aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblamiento y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar a través de la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden haber inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991); y la Patente de Estados Unidos No. 5.750.373.

El término “región hipervariable”, cuando se utiliza en la presente invención, hace referencia a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991]) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Clothia y Lesk, J. Mole. Biol. 196:901-917 [1987]). Los residuos de “estructura” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable tal como se define aquí.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “inmunoadhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan el “dominio de unión” de una proteína heteróloga “adhesina” (por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con un dominio constante de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada y que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno (sitio de combinación a antígeno) de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina.

El término “dominio de unión a ligando”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier receptor de la superficie celular nativo o cualquier región o derivado de la misma que mantiene por lo menos una capacidad cualitativa de unión a ligando de un receptor nativo correspondiente. En una realización específica, el receptor es de un polipéptido de la superficie celular que presenta un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la supergenfamilia de inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la supergenfamilia de inmunoglobulinas, pero, sin embargo, están cubiertas por esta definición, son receptores para las citoquinas y, en particular, receptores con actividad tirosina quinasa (receptores tirosina quinasa), miembros de la hematopoyetina y superfamilias del receptor del factor de crecimiento nervioso, y moléculas de adhesión celular, por ejemplo, selectinas (E, L y P).

El término “dominio de unión a receptor” se utiliza para designar cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo las moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que mantiene por lo menos una capacidad cualitativa de unión a receptor de un ligando nativo correspondiente. Esta definición, entre otras, incluye específicamente secuencias de unión de ligandos para los receptores mencionadas anteriormente.

Una “quimera anticuerpo-inmunoadhesina” comprende una molécula que combina por lo menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal como se define aquí) con por lo menos una inmunoadhesina (tal como se define en esta solicitud). Las quimeras anticuerpo-inmunoadhesina de ejemplo son las quimeras CD4-IgG biespecífica descrita en Berg *et al.*, PNAS (USA) 88: 4723-4727 (1991) y Chamow *et al.*, J. Immunol. 153: 4268 (1994).

El término “preparación”, tal como se utiliza en la presente invención, se utiliza para definir una composición o glicoproteína que se ha identificado y separado y/o recuperado como componente de su medio. Los componentes contaminantes de su medio son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para la composición o glicoproteína, tales como glicofomas no deseadas o pretendidas, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. La preparación de la presente invención está sustancialmente libre de estos contaminantes. En realizaciones preferidas, la preparación de glicoproteínas se purificará (1) hasta más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción por plata.

Para los objetivos de la presente invención, una “preparación farmacéutica” es la que está adaptada y es adecuada para la administración a un mamífero, especialmente un humano. De este modo, la composición se puede utilizar para tratar una enfermedad o trastorno en el mamífero. Además, la glicoproteína, que es el principio activo en la composición, se ha sometido a una o más etapas de purificación y aislamiento, de manera que se ha separado de la misma el contaminante o contaminantes que podrían interferir con su uso terapéutico. En general, la preparación farmacéutica comprende la glicoproteína terapéutica y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, ejemplos de los cuales se describen a continuación. La preparación es normalmente estéril, y puede estar liofilizada.

Para los objetivos de la presente invención, una “glicoproteína parental” es una glicoproteína que presenta la misma secuencia de aminoácidos y la estructura de carbohidratos central madura como una variante de la glicoproteína de la presente invención, excepto que la fucosa está unida a la estructura de carbohidratos central madura. Por ejemplo, en una composición que comprende la glicoproteína parental, aproximadamente 50-100% o aproximadamente 70-100% de la glicoproteína parental comprende una estructura de carbohidratos central madura que presenta fucosa unida a la misma.

La variante de glicoproteína que se une a un FcR con “mejor afinidad” que una glicoproteína parental, es aquella que se une a alguno o más de los FcRs identificados anteriormente con una afinidad de unión sustancialmente mejor que la glicoproteína parental, cuando las cantidades de la variante de glicoproteína y polipéptido parental en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante de glicoproteína con mejor afinidad de unión por FcR puede mostrar de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces de mejor en la afinidad de unión a FcR en comparación con la glicoproteína parental, donde la afinidad de unión por FcR se determina, por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos de la presente invención.

La variante de glicoproteína que “media en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en la presencia de células efectoras humanas de manera más eficaz” que un polipéptido parental es aquella que *in vitro* o *in vivo* es sustancialmente más eficaz en la mediación de ADCC, cuando las cantidades de variante de glicoproteína y glicoproteína parental utilizadas en el ensayo son esencialmente las mismas. En general, dichas variantes de glicoproteína se identificarán utilizando el ensayo de ADCC *in vitro* tal como se describe en la presente invención, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo, en un modelo animal, etc. La variante de glicoproteína preferida es de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo, de aproximadamente dos veces a aproximadamente cincuenta veces, más eficaz en la mediación de ADCC que la parental, por ejemplo, en el ensayo *in vitro* descrito en la presente invención.

Una “modificación de aminoácidos” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Las modificaciones de ejemplo incluyen una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos. La modificación de aminoácidos preferida aquí es una sustitución.

Una “modificación de aminoácidos en” una posición específica, por ejemplo, de la región Fc, se refiere a la sustitución o eliminación del residuo especificado, o la inserción de por lo menos un residuo de aminoácidos adyacente al residuo especificado. Por inserción “adyacente” de un residuo específico se entiende la inserción a uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo especificado.

Una “sustitución de aminoácido” se refiere a la sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácido predeterminada con otro residuo de aminoácido de sustitución “diferente”. El residuo o residuos de sustitución pueden ser “residuos de aminoácidos naturales” (es decir, codificados por el código genético) y se seleccionan del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico

(Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). Preferiblemente, el residuo de sustitución no es cisteína. La sustitución por uno o más residuos de aminoácidos no naturales también está comprendida por la definición de una sustitución de aminoácido de la presente invención. Un “residuo de aminoácido no natural” se refiere a un residuo, diferente de los residuos de aminoácidos naturales indicados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a residuo o residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Entre los ejemplos de residuos de aminoácidos no naturales se incluyen norleucinas, ornitina, norvalina, homoserina y otros residuos de aminoácidos análogos, tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991). Para generar dichos residuos de aminoácidos no naturales, se pueden utilizar los procedimientos de Noren *et al.* Science 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, *supra*. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de una transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

Una “inserción de aminoácido” se refiere a la incorporación de por lo menos un aminoácido en una secuencia de aminoácido predeterminada. Aunque la inserción consistirá habitualmente en la inserción de uno o dos residuos de aminoácidos, la presente solicitud contempla “inserciones de péptidos” más grandes, por ejemplo, inserción de aproximadamente tres a aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez residuos de aminoácidos. El residuo o residuos insertados pueden ser naturales o no naturales tal como se ha descrito anteriormente.

Una “eliminación de aminoácido” se refiere a la eliminación de por lo menos un residuo de aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

“C1q” es un polipéptido que incluye un sitio de unión por la región Fc de un inmunoglobulina, C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente del mecanismo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El C1q humano se puede adquirir comercialmente de, por ejemplo, Quidel, San diego, CA.

“Tratamiento” hace referencia tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o a sus medidas preventivas. Aquellos que necesiten un tratamiento incluyen los que ya han desarrollado el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir su aparición.

Un “trastorno” o “enfermedad” en la presente invención es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la glicoproteína. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. En una realización, el trastorno es cáncer, una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, infección u otra afección, tal como bocio, donde se desea la eliminación del tejido o células no deseadas. La enfermedad o trastorno preferido a tratar aquí es cáncer o una enfermedad autoinmune.

Los términos “cáncer” y “canceroso” hacen referencia o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a éstos, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma, y la leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hematoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Un “tumor de células B” incluye en la presente invención linfoma que no es de Hodgkin (NHL), incluyendo NHL folicular/grado bajo, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL folicular/grado intermedio, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado superior, NHL linfoblástico de grado superior, NHL de células no separadas pequeñas de grado superior, NHL de enfermedad de gran carga, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA y Macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas y leucemia mieloblástica crónica; y otros tumores hematológicos; Dichos tumores se pueden tratar con anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie de células B, tales como CD20.

Un cáncer “independiente de hormonas” es aquel en el que la proliferación del mismo no depende de la presencia de una hormona que se une a un receptor expresado por células en el cáncer. Dichos cánceres no experimentan regresión clínica tras la administración de estrategias farmacológicas o quirúrgicas que reducen la concentración de hormonas en el tumor o próximo al mismo. Entre los ejemplos de cánceres independientes de hormonas incluyen cáncer de próstata independiente de andrógeno, cáncer de mama independiente de estrógeno, cáncer endometrial y cáncer ovárico. Dichos cánceres pueden comenzar como tumores dependientes de hormonas y progresar desde una etapa sensible a hormonas a un tumor refractario de hormonas después de terapia anti-hormonal.

Una “enfermedad autoinmune” de la presente invención no es una enfermedad o trastorno no tumoral que surge de y está dirigido contra un tejido del propio individuo. Entre los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes se incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); escleroderma y esclerosis; respuestas asociadas con enferme-

dad inflamatoria intestinal (tal como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de insuficiencia respiratoria (incluyendo síndrome de insuficiencia respiratoria adulta; ARDS); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveitis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia en adhesión leucocitaria; artritis reumatoide; lupus sistémico eritematoso (SLE); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus Tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomielitis alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citoquinas y linfocitos T halladas normalmente en la tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis por leucocito; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión multiorgánica; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana base anti-glomerular; síndrome antifosfolípidos; neuritis alérgica; enfermedad de Grave; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide ampoloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis compleja inmune; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune, etc.

Un “trastorno inflamatorio” se refiere a estados patológicos que dan lugar a la inflamación, habitualmente causada por quimiotaxis de neutrófilos. Entre los ejemplos de dichos trastornos se incluyen enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo psoriasis y dermatitis atópica; escleroderma sistémico y esclerosis; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); trastornos de reperfusión isquémica, incluyendo lesión por reperfusión de tejido quirúrgico, afecciones isquémicas miocárdicas, tales como infarto de miocardio, parada cardíaca, reperfusión después de cirugía cardíaca y constricción después de angioplastia coronaria transluminal percutánea, apoplejía y aneurismas aórticos abdominales; edema cerebral secundario a apoplejía; traumatismo craneal; choque hipovolémico; asfixia; síndrome de insuficiencia respiratoria adulta; lesión aguda del pulmón; Enfermedad de Behcet; dermatomiositis; polimiositis; esclerosis múltiple; dermatitis; meningitis; encefalitis; uveitis; osteoartritis; nefritis lúpica; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, síndrome de Sjorgen, vasculitis; enfermedades que implican Diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión multiorgánico secundario a septicemia o traumatismo; hepatitis alcohólica; pneumonia bacteriana; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, incluyendo glomerulonefritis; sepsis; sarcoidosis; respuestas inmunopatológicas a transplante de tejido/órgano; inflamaciones del pulmón, incluyendo pleuresía, alveolitis, vasculitis, pneumonia, bronquitis crónica, bronquiectasia, panbronquiolitis difusa, pneumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), y fibrosis quística; etc. Las afecciones preferidas incluyen lesión aguda de pulmón, síndrome de insuficiencia respiratoria adulta, reperfusión isquémica (incluyendo lesión por reperfusión de tejido quirúrgico, isquemia miocárdica, e infarto agudo de miocardio), choque hipovolémico, asma, pneumonia bacteriana y enfermedad inflamatoria intestinal, tales como colitis ulcerosa. Las enfermedades autoinmunes también se pueden solapar con enfermedades inflamatorias y viceversa.

Por “bloquear la respuesta inmune” a un antígeno extraño se entiende reducir o prevenir por lo menos una respuesta mediada por el sistema inmune resultante de la exposición a un antígeno extraño. Por ejemplo, se puede reducir la respuesta humoral al antígeno extraño, es decir, mediante la prevención o reducción de la producción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno en el mamífero. Alternativamente, o adicionalmente, se puede suprimir el idiotipo; “tranquilizar” la extracción de células recubiertas con aloanticuerpos; y/o influir en la presentación de aloantígenos a través de la depleción de células presentadoras de antígenos.

Por “antígeno extraño” se entiende una molécula o moléculas que no son endógenas o nativas a un mamífero que está expuesto a las mismas. El antígeno extraño puede producir una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta humoral y/o mediada por células T en el mamífero. Generalmente, el antígeno extraño provocará la producción de anticuerpos contra el mismo. Entre los ejemplos de antígenos extraños que se contemplan aquí se incluyen agentes terapéuticos inmunogénicos, por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos, particularmente anticuerpos que comprenden residuos de aminoácidos no humanos (por ejemplo, anticuerpos de roedores, quimérico/humanizado y privatizado); toxinas (opcionalmente conjugadas a una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, en el que la molécula de reconocimiento puede ser también inmunogénica); vectores virales de terapia génica, tales como retrovirus y adenovirus, injertos; agentes infecciosos (por ejemplo, bacterias y virus); aloantígenos (es decir, un antígeno que aparece en algunos, pero no en otros miembros de la misma especie), tales como diferencias en los tipos de sangre, antígenos de linfocitos humanos (HLA), antígenos de plaquetas, antígenos expresados en órganos transplantados, componentes sanguíneos, embarazo (Rh) y factores hemofílicos (por ejemplo Factor VIII y Factor IX).

Un “antígeno asociado a tumor” para los objetivos de la presente invención es un antígeno caracterizado por una expresión superior en células tumorales en comparación con células tumorales. Entre los ejemplos específicos se incluyen receptores ErB, marcadores de superficie de células B, gangliósido GD2, GD3 y GM2 (Ragupathi G., Cancer Immunol. Immunoether. 43: 152 (1996)); CD52 (Ginaldi *et al.*, Leukemia Research 22: 185 (1998)); antígeno de células madre de próstata (PSCA); y MAGE (Kirkin *et al.*, APMIS 106: 665 (1998)).

Un “factor angiogénico” aquí es una molécula que estimula la angiogénesis. Entre los ejemplos se incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido o básico (FGF) y factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF).

Un “receptor ErbB” es un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB e incluye EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 y otros miembros de esta familia a identificar en el futuro. El receptor ErbB comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando ErbB; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxil terminal que alberga varios residuos de tirosina que se pueden fosforilar.

Los términos “ErbB1”, “receptor de factor de crecimiento epidérmico”, y “EGFR” se utilizan indistintamente en la presente invención y se refiere como EGFR tal como se describe, por ejemplo, en Carpenter *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987), incluyendo formas mutantes naturales del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante por eliminación como en Humphrey *et al.* PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1990)). erbB1 se refiere al gen que codifica el producto de la proteína EGFR.

Las expresiones “ErbB2” y “HER2” se utilizan indistintamente aquí y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba *et al.*, PNAS (USA) 82: 6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al.*, Nature 319: 230-234 (1986) (número de acceso Genebank X03363).

Entre los ejemplos de anticuerpos que se une a HER2 se incluyen 4D5, 7C2, 7F3 y 2C4, así como variantes humanizadas de los mismos, incluyendo huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8, tal como se describen en la Tabla 3 de la patente de Estados Unidos No. 5.821.337, incorporada expresamente en la presente por referencia; y 2C4 mutante humanizado nos. 560, 561, 562, 568, 569, 570, 571, 574 o 56689 tal como se describe en WO01/00245. 7C2 y 7F3 y las variantes humanizadas de los mismos se describen en WO98/17797. Los anticuerpos preferidos son aquellos que comprenden las regiones variables pesada y ligera de huMAb4D5-8, o 2C4 mutante humanizado 574.

“Trastuzumab” (HERCEPTIN®) es un anticuerpo humanizado derivado de ADN recombinante que se une con afinidad elevada en un ensayo de base celular (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de HER2. El anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de la variante huMAb4D5-8 tal como se describe en la Tabla 3 en la Patente de Estados Unidos 5.821.337. El anticuerpo es producido por células CHO-DP12.

“ErbB3” y “HER3” se refieren al polipéptido receptor tal como se describe en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos no. 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraues *et al.* PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989).

Los términos “ErbB4” y “HER4” se refieren aquí al polipéptido receptor tal como se describe en, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea No. 599.274; Plowman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993) y Plowman *et al.* nature, 366: 473-475 (1993), incluyendo las isoformas de los mismos, por ejemplo, tal como se describen en WO99/19488, publicada el 22 de abril de 1999.

“Un marcador de superficie de célula B” aquí es un antígeno expresado en la superficie de una célula B que se puede dirigir con un anticuerpo al que se une. Ejemplos de marcadores de superficie de célula B incluyen los marcadores de superficie de leucocito CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86. El marcador de superficie de célula B se particular interés se expresa preferencialmente en células B en comparación con otros tejidos que no son células B de un mamífero y se pueden expresar tanto en células B precursoras como en células B maduras. En una realización, el marcador es aquel, como CD20 o CD19, que se encuentra en las células B en toda la diferenciación del linaje de la etapa de célula madre hasta un punto justo anterior a la diferenciación terminal en las células plasmáticas. Los marcadores de célula B preferidos aquí son CD19, CD20, CD22 y CD40.

El antígeno “CD20” es una fosfoproteína no glicosilada de aproximadamente 35 kDa que se encuentra en la superficie de más del 90% de células B de sangre periférica u órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de la pre-célula B y permanece hasta la diferenciación de la célula plasmática. CD20 está presente en células B normales y células B malignas. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen “antígeno limitado a linfocito B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark *et al.* PNAS (USA) 82: 1766 (1985), por ejemplo.

Ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 incluyen. “C2B8” que se denomina ahora “Rituximab” (“RITXIMAB®”) (Patente de Estados Unidos No. 5.736.137, expresamente incorporada en la presente por referencia); el anticuerpo murino 2B8 marcado con ytrio [90] designado “Y2B8” (Patente de Estados Unidos No. 5.736.137, expresamente incorporada en la presente por referencia); “B1” de IgG2a murino opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo “¹³¹I-B1” (BEXXAR™) (Patente de Estados Unidos No. 5.595.721, expresamente incorporada en la presente por referencia); anticuerpo monoclonal murino “1F5” (Press *et al.*, Blood 69(2): 584-591 (1987)); anticuerpo “químérico 2H7” (Patente de Estados Unidos no. 5677.180, expresamente incorporada en la presente por referencia); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NUB2 disponible de la International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press (1987)).

Los términos “Rituximab” o “RITUXAN®” se refieren aquí al anticuerpo monoclonal murino/humano químérico diseñado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 y designado como “C2B8” en la Patente de Estados Unidos No. 5.736.137, expresamente incorporada en la presente por referencia. El anticuerpo es una inmunoglobulina kappa

IgG1 que contiene secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada murina y secuencias de la región constante humana. Rituximab tiene una afinidad de unión para el antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM. Rituximab es producido por células CHODG44.

- 5 El término “mamífero” incluye cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la presente invención, el mamífero es un humano.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (por ejemplo, una célula cancerosa) *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células en la fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente a la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también influyen en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes y antineoplastic drugs” de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13.

20 Ejemplos de anticuerpos “inhibidores del crecimiento” son aquellos que se unen a un antígeno e inhiben el crecimiento de células que expresan ese antígeno. Los anticuerpos anti-HER2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales de mama SK-BR-3 en un cultivo celular en más de un 20%, y preferiblemente en más de un 50% (por ejemplo, desde aproximadamente un 50% hasta aproximadamente un 100%) en una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, donde la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.677.171, concedida el 14 de octubre de 1997). El anticuerpo inhibidor de crecimiento preferido es huMAb4D5-8.

Un anticuerpo que “induce la muerte celular” es aquel que provoca que una célula viable se vuelva no viable. La célula aquí es aquella que expresa el antígeno al que se une el anticuerpo. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de complemento y células efectoras inmunes para diferenciar la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo para la muerte celular se realiza utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propicio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.* *Cytotechnology* 17: 1-11 (1995)) o 7AAD, en relación con células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular preferidos son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Un anticuerpo que induce apoptosis es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de anexina V, la fragmentación de ADN, pérdida de volumen celular, dilatación de retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula expresa el antígeno al que se une el anticuerpo. Preferiblemente, la célula es un tumor celular. Existen varios métodos disponibles para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de fosfatidil serina (PS) mediante la unión a anexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del escalado de ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se puede evaluar mediante cualquier incremento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es aquel que da lugar a aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferiblemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión a anexina en relación a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina utilizando células BT474.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño de la célula; inhibir (es decir, reducir en cierto grado y preferiblemente parar) la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, reducir en cierto grado y preferiblemente parar) la metástasis del tumor; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierto grado uno o más síntomas asociados con el cáncer. Siempre y cuando el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o matar células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo para la progresión del tumor (TTP) y/o determinando la velocidad de respuesta (RR).

Un “cáncer que expresa antígenos” es aquel que comprende células que tienen niveles suficientes de antígeno en la superficie de las células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-antígeno se puede unir al mismo y tener un efecto terapéutico respecto al cáncer.

Un cáncer “caracterizado por una activación excesiva” de un receptor es aquel en el que el grado de activación del receptor en células cancerosas supera de manera significativa el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede resultar de la sobreexpresión del receptor y/o puede ser superior a los niveles normales de un ligando disponible para la activación del receptor en las células cancerosas.

Dicha activación excesiva puede causar y/o ser causada por el estado maligno de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se someterá a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o sobreexpresión de un receptor tiene lugar, lo cual da como resultado una activación excesiva del receptor. Alternativamente, o adicionalmente, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o sobreexpresión de un ligando tiene lugar en el cáncer, lo cual se atribuye a una activación excesiva del receptor. En un subgrupo de cánceres, la activación excesiva del receptor puede resultar del mecanismo estimulador autocrino.

Un cáncer que “sobreexpresa” un receptor es aquel que presenta niveles significativamente más elevados de un receptor, tal como HER2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de célula. Dicha sobreexpresión puede ser causada por la amplificación génica o por el incremento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión del receptor se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de mayores niveles de la proteína receptora en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el receptor en la célula, por ejemplo, a través de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre de 1998), transferencia southern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del receptor midiendo el antígeno propagado (por ejemplo, dominio extracelular) en un fluido biológico, tal como suero (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.933.294, concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; Patente de Estados Unidos 5.401.6389 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.*, J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos *in vivo* disponibles para el técnico en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo de la radioactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo.

Un cáncer que “sobreexpresa” un ligando es aquel que produce niveles significativamente más elevados del ligando en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por el incremento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión del ligando se puede determinar de manera diagnóstica mediante la evaluación de los niveles de ligando (o el ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo, en la biopsia de un tumor o mediante varios ensayos de diagnóstico, tales como IHC, FISH, transferencia southern, PCR, o ensayos *in vivo* descritos anteriormente.

El término “agente citotóxico” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como, tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXANTM); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloroetamina, clorhidrato de óxido de mecloroetamina, melfalán, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinás, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carninomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorubicina, isarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido amino-levulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofílnico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; si-zofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida: tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida: mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; carminomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente

aceptables. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazolas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Tal como se utiliza aquí, el término “fármaco dirigido a EGFR” se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Entre los ejemplos de dichos agentes se incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Entre los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR se incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente Estados Unidos No. 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225) y 225 humano con nueva forma (H225) (véase, WO96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen a EGFR mutante tipo II (Patente de Estados Unidos No. 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR (véase WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, EP659439A2, Merck Patent GMBH). Entre los ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR se incluyen ZD1839 (IRESSA®) (Astra Zeneca), CP-358774 u OSI-774 (TARCEVA™) (Genentech) y AG1478.

El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término “profármaco”, tal como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a un precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Willman, Prodrugs in Cancer Chemotherapy, Biochemical Society Transactions, 14:375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), y Stella *et al.*, Prodrugs: A Chemical approach to targeted drug delivery, Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.) pág. 147-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosfosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamidas opcionalmente sustituidas o profármacos que contienen fenilacetamidas opcionalmente sustituidas, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en un fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en profármacos para su utilización en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como las composiciones de glicoproteínas descritas en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

El término “prospecto” se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

Tal como se utiliza aquí, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. De este modo, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que presenta la misma función o actividad biológica cribada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan designaciones diferentes, serán claras a partir del texto.

II. Modos para llevar a cabo la presente invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar una preparación sustancialmente homogénea de una glicoproteína que contiene una región Fc, donde aproximadamente el 80-100% de la glicoproteína en la composición comprende un carbohidrato central maduro que carece de fucosa unido a la región Fc de la glicoproteína. En las realizaciones preferidas de la presente invención, la proteína es un anticuerpo o inmunoadhesina. Las glicoproteínas se pueden preparar, por ejemplo, mediante (a) el uso de una célula huésped manipulada o mutante que es deficiente en el metabolismo de fucosa, de manera que ha reducido la capacidad (o es incapaz) de fucosilar proteínas expresadas en la misma; (b) el cultivo de células bajo condiciones que previenen o reducen la fucosilación; (c) la eliminación post-transduccional de fucosa (por ejemplo, con una enzima fucosidasa); (d) la adición post-transduccional del carbohidrato deseado, por ejemplo, después de la expresión recombinante de una glicoproteína no glicosilada; (e) purificación de la glicoproteína para seleccionar el producto que no está fucosilado. La presente invención contempla la combinación de dos o más de estos procedimientos de ejemplo (a)-(e).

Más preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la glicoproteína deseada se expresa en una célula huésped que presente una capacidad reducida (o es incapaz) de fucosilar proteínas expresadas en la misma. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo, una célula CHO Lec13, o por ejemplo, una célula huésped CHO-K1, DUX-B11, CHO-DP12 o CHO-DG44 que se ha modificado, de manera que la glicoproteína producida en la misma no está sustancialmente fucosilada. De este modo, la célula puede mostrar una expresión o actividad alterada para la enzima fucosiltransferasa u otra enzima o sustrato implicados en la adición de fucosa al oligosacárido unido a N pueden tener una actividad reducida y/o niveles reducidos en la célula huésped.

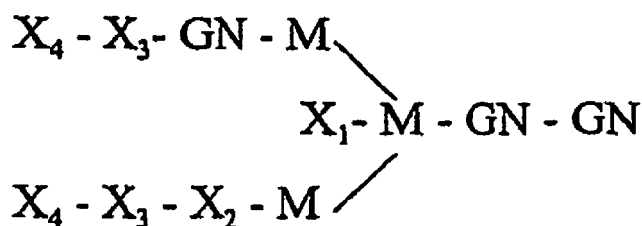
La estructura de carbohidrato central es madura, es decir, debería evitarse en general el uso de inhibidores, tales como castanospermina, que inhiben o interfieren con el procesamiento del carbohidrato maduro. Según una realización preferida de la presente invención, aproximadamente el 80-100% de la glicoproteína en la composición recuperada de la célula huésped recombinante que produce la glicoproteína tendrá una estructura de carbohidrato central que carece de fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína, de aquí en adelante “composición de glicoproteína sin fucosa”. Por “recuperada” se entiende aquí el material obtenido directamente de la célula huésped sin someter dicho material a una etapa de purificación que enriquece la glicoproteína sin fucosa.

Sin embargo, la presente invención contempla el enriquecimiento de la cantidad de glicoproteína sin fucosa mediante varias técnicas, tales como la purificación que utiliza un sustrato de lectinas para eliminar la glicoproteína que contiene fucosa de la composición deseada.

Se entenderá que la cantidad de glicoproteína sin fucosa de varios lotes de glicoproteína producida recombinantemente puede variar. Por ejemplo, en los siguientes Ejemplos, el % de oligosacáridos total sin fucosa unida a la glicoproteína expresada por las células CHO-Lec13 variaba del 88% al 95%.

Preferiblemente, aproximadamente el 90-99% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína.

Pueden existir varias formas de la estructura de carbohidrato en la composición. Por ejemplo, el carbohidrato unido a la glicoproteína se puede representar por la siguiente fórmula:



donde,

M es manosa.

GN es GlcNAc.

X_1 es un residuo GlcNAc bisectante opcional con monosacárido o monosacáridos adicionales unidos opcionalmente al GlcNAc bisectante.

X_2 es un residuo GlcNAc preferido.

X_3 es un residuo Gal opcional, un residuo Gal puede estar unido a cada brazo de GN.

X_4 es un residuo de ácido siálico terminal opcional, uno o dos residuos de ácido siálico pueden estar unidos.

Las composiciones de glicoproteína sin fucosa de la presente invención muestran una mejor unión a uno o más receptores FcγRIII, en comparación con una composición de la misma glicoproteína, pero donde la mayoría de la glicoproteína (por ejemplo, aproximadamente 50-100%, o aproximadamente 70-100%) en la composición tiene fucosa unida a la estructura de carbohidrato central madura (de aquí en adelante una “composición de glicoproteína que contiene fucosa”). Por ejemplo, las composiciones de glicoproteína sin fucosa de la presente invención pueden mostrar de 100 a 1000 veces una mejor unión a un FcγRIII, tal como FcγRIII (F158), cuando se compara con la composición de glicoproteína que contiene fucosa. El hecho de que el alotipo F158 sea menos eficaz en la interacción con IgG humana que V158 se cree que proporciona una ventaja significativa desde una perspectiva terapéutica, especialmente en pacientes que expresan FcγRIII(P158). Además, las composiciones de glicoproteína sin fucosa de la presente invención muestran una mejor actividad ADCC en comparación con sus equivalentes composiciones de glicoproteína que contienen fucosa, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 20 veces mejor actividad de ADCC.

Aparte de la estructura de carbohidrato central madura sin fucosa, se pueden unir oligosacáridos adicionales a la estructura de carbohidrato central. Por ejemplo, puede estar unido o no un GlcNAc bisectante. A modo de ejemplo, la célula huésped puede carecer de la enzima GnTIII y, por tanto, la glicoproteína puede estar esencialmente libre de GlcNAc bisectante. Alternativamente, la glicoproteína se puede expresar en la célula huésped (por ejemplo, una célula CHO huésped o manipulada Y0) que añade un GlcNAc bisectante. Uno o más residuos de galactosa (generalmente uno o dos) pueden estar unidos a la estructura de carbohidrato central. Finalmente, uno o más residuos de ácido siálico terminales (normalmente uno o dos) pueden estar unidos a la estructura de carbohidrato central, por ejemplo, mediante la unión a un residuo o residuos de galactosa.

Las composiciones de la presente invención, en la realización preferida, se preparan y están destinadas al uso terapéutico. Por tanto, la composición preferida es una preparación farmacéutica que comprende la glicoproteína y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como los ejemplificados a continuación. Dichas preparaciones son normalmente estériles y pueden liofilizarse.

En la realización preferida de la presente invención, la glicoproteína es un anticuerpo y los procedimientos de ejemplo para generar anticuerpos se describen con más detalle en las siguientes secciones. Sin embargo, la glicoproteína puede ser cualquier otra glicoproteína que comprende una región Fc, por ejemplo, una inmunoadhesina. Los procedimientos para fabricar inmunoadhesinas se elaboran con más detalle a continuación.

A. Secuencias de la región Fc variantes

En una realización de la presente invención, la variante de glicosilación comprende además una región Fc variante con una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa. Cuando la región Fc variante presenta más de una sustitución de aminoácido, generalmente, pero no necesariamente, las sustituciones en la misma clase se combinan para conseguir el resultado deseado. En la siguiente tabla se describen varias clases de sustituciones de aminoácidos.

ES 2 326 964 T3

TABLA 1

CLASES DE VARIANTES DE REGIÓN Fc		
Clase	Propiedad de unión a FcR	Posición de la sustitución o sustituciones en la región Fc
1A	unión reducida a todas las FcγR	238, 265, 269, 270, 297*, 327, 329
1B	unión reducida a FcγRII y FcγRIII	239, 294, 295, 303, 338, 373, 376, 416, 435
2	unión mejorada a FcγRII y FcγRIII	256, 290, 312, 326, 330, 339, 378, 430
3	unión mejorada a FcγRII y sin efecto sobre la unión a FcγRIII	255, 258, 267, 276, 280, 283, 285, 286, 305, 307, 309, 315, 320, 331, 337, 398
4	unión mejorada a FcγRII y unión reducida a FcγRIII	268, 272, 301, 322, 340
5	unión reducida a FcγRII y sin efecto sobre la unión a FcγRIII	292, 324, 335, 414, 419, 438, 439
6	unión reducida a FcγRII y unión mejorada a FcγRIII	298, 333
7	sin efecto sobre la unión a FcγRII y unión reducida a FcγRIII	248, 249, 252, 254, 278, 289, 293, 296, 338, 382, 388, 389, 434, 437
8	sin efecto sobre la unión a FcγRII y unión mejorada a FcγRIII	334, 360
* versión desglicosilada		

A parte de las sustituciones de aminoácidos, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región Fc parental con el fin de generar una variante la región Fc con una función efectora alterada.

Por ejemplo, se pueden eliminar uno o más residuos de aminoácidos de la región Fc con el fin de reducir la unión a una FcR. Generalmente, se eliminarán uno o más residuos de la región Fc identificados en la presente invención como que afectan a la unión a FcR con el fin de generar dicha variante de la región Fc. Generalmente, no más de uno a aproximadamente diez residuos de la región Fc se eliminarán según esta realización de la presente invención. La región Fc de la presente invención que comprende una o más eliminaciones de aminoácidos mantendrá preferiblemente por lo menos aproximadamente un 80%, y preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90%, y lo más preferible por lo menos aproximadamente un 95% de la región Fc parental o de una región Fc humana de secuencia nativa.

También se pueden fabricar variantes de la región Fc por inserción de aminoácidos, donde dichas variantes presentan la función efectora alterada. Por ejemplo, se puede introducir por lo menos un residuo de aminoácido (por ejemplo, de uno o a dos residuos de aminoácidos y generalmente no más de diez residuos) adyacentes a una o más posiciones de la región Fc identificadas en la presente invención como que impactan en la unión a FcR. Por “adyacente” se entiende en uno a dos residuos de aminoácidos de un residuo de la región Fc identificada en la presente invención. Dichas variantes de la región Fc pueden mostrar una unión a FcR y/o actividad ADCC aumentada o disminuida. Con el fin de generar dichas variantes de inserción, se puede evaluar una estructura co-cristalina de un polipéptido que comprende una región de unión de una FcR (por ejemplo, el dominio extracelular de la FcR de interés) y la región FcR en la que el

residuo o residuos de aminoácidos a insertar (ver, por ejemplo, Deisenhofer, *Biochemistry* 20(9): 2361-2370 (1981); y Burmeister *et al.*, *Nature* 342: 379-383 (1994)) con el fin de diseñar racionalmente una variante de región Fc con, por ejemplo, la capacidad de unión a FcR mejorada. Dicha inserción o inserciones se realizará generalmente en un bucle de la región Fc, pero no en la estructura secundaria (es decir en una hebra β) de la región Fc.

Mediante la introducción de las modificaciones de la secuencia de aminoácidos adecuada en una región Fc parental, se puede generar una región Fc efectora que (a) media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficazmente y/o (b) se une a un receptor de Fc gamma (Fc γ R) con una mayor afinidad que el polipéptido parental. Dichas variantes de la región Fc comprenderán generalmente por lo menos una modificación de aminoácido en la región Fc. Se cree que la combinación de modificaciones de aminoácidos es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc., sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones de la región Fc específica identificada en la presente invención.

Preferiblemente, la región Fc del polipéptido parental es una región Fc humana, por ejemplo, región Fc humana de secuencia nativa, región Fc humana de IgG1 (alotipos A y no A), IgG2, IgG3 ó IgG4. Dichas secuencias se muestran en la figura 23.

Para generar una región Fc con actividad ADCC mejorada, el polipéptido parental presenta preferiblemente una actividad ADCC preexistente, por ejemplo, comprende una región Fc de IgG1 humana o IgG3 humana. En una realización, la variante con ADCC mejorada media la ADCC sustancialmente más eficazmente que un anticuerpo con una región Fc de IgG1 ó IgG3 de secuencia nativa y la región de unión a antígeno de la variante. Preferiblemente, la variante comprende, o consiste esencialmente en, sustituciones de dos o tres de los residuos en las posiciones 298, 333 y 334 de la región Fc. Lo más preferible, los residuos en las posiciones 298, 333 y 334 se sustituyen (por ejemplo, por residuos de alanina). Además, con el fin de generar la variante de la región Fc con actividad ADCC mejorada, se manipulará generalmente una variante de la región Fc con una mejor afinidad de unión por Fc γ RIII, que se cree que es una FcR importante para mediar la ADCC. Por ejemplo, se puede introducir una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en la región Fc parental en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 ó 430 para generar dicha variante. La variante con afinidad de unión por Fc γ RIII mejorada puede presentar también afinidad de unión reducida por Fc γ RII, especialmente afinidad reducida por el receptor Fc γ RIIB inhibitor.

La modificación o modificaciones de aminoácidos se introducen preferiblemente en el dominio CH2 de la región Fc, ya que los experimentos de la presente invención indican que el dominio CH2 es importante para la actividad de unión a FcR. Además, a diferencia de las enseñanzas de la técnica citada anteriormente, la presente solicitud contempla la introducción de una modificación en una parte de la región Fc diferente de la región bisagra inferior de la misma.

Las posiciones de aminoácidos útiles para la modificación con el fin de generar una región Fc de IgG variante con afinidad de unión o actividad del receptor gamma de Fc alterado (Fc γ R) incluyen cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc. Preferiblemente, la región Fc parental utilizada como plantilla para generar dichas variantes comprende una región Fc de IgG humana. Cuando se sustituye el residuo 331, la región Fc parental es preferiblemente IgG3 de secuencia nativa no humana o la región Fc variante que comprende una sustitución en la posición 331 muestra preferiblemente una unión aumentada a FcR, por ejemplo, a Fc γ RII.

Para generar una variante de la región Fc con unión reducida a la Fc γ R se puede introducir una modificación de aminoácido en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc.

Las variantes que muestran una unión reducida a Fc γ RI incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos en la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 ó 329.

Las variantes que muestran una unión reducida a Fc γ RII incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439.

Las variantes de la región Fc que muestran una unión reducida a Fc γ RIII incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437.

También se pueden fabricar variantes con una unión mejorada a uno o más Fc γ Rs. Dichas variantes de la región Fc pueden comprender una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones

ES 2 326 964 T3

de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 ó 430 de la región Fc.

Por ejemplo, la variante con una actividad de unión a FcγR mejorada puede mostrar una mayor unión a FcγRIII y opcionalmente puede mostrar además una unión disminuida a FcγRII; por ejemplo, la variante puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 298 y/o 333 de una región Fc.

Las variantes con una mayor unión a FcγRII incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 337, 340, 378, 398 ó 430 de una región Fc. Dichas variantes pueden mostrar además una menor unión a FcγRIII. Por ejemplo, pueden incluir una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 268, 272, 298, 301, 322 ó 340.

Aunque se prefiere alterar la unión a un FcγR, las variantes de la región Fc con afinidad de unión alterada por el receptor neonatal (FcRn) también se contemplan en la presente invención. Se conoce que las variantes de la región Fc con afinidad mejorada por FcRn presentan una vida media en suero más larga y dichas moléculas tendrán aplicaciones útiles en los métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una vida media larga del polipéptido deseado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico. En cambio, se espera que las variantes de la región Fc con una menor afinidad de unión a FcRn tengan vidas medias más cortas y dichas moléculas se pueden administrar, por ejemplo, a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, por ejemplo, para el diagnóstico por imagen *in vivo* o para polipéptidos que presentan efectos secundarios tóxicos cuando se para la circulación en el torrente sanguíneo durante largos periodos de tiempo, etc. Se conoce que es menos probable que las variantes de la región Fc con una menor afinidad de unión a FcRn atraviesen la placenta y, por tanto, se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

Las variantes de la región Fc con afinidad de unión por FcRn alterada incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 ó 447. Los que muestran una menor unión a FcRn comprenderán generalmente una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 ó 447; y aquellos con una mayor unión a FcRn comprenderá habitualmente una modificación de aminoácidos de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434.

La variante o variantes de los polipéptidos preparadas tal como se ha descrito anteriormente se pueden someter a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso pretendido del polipéptido. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o eliminación de residuos de aminoácidos), la fusión a un polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes. Dichas “modificaciones adicionales” se pueden realizar antes, simultáneamente o posteriormente a la modificación o modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente que dan lugar a una alteración de la unión al receptor de Fc y/o actividad ADCC. En una realización, se puede combinar la modificación de la región Fc de la presente invención con las sustituciones de la región Fc descritas en las referencias en la sección “Técnica relacionada” de la presente solicitud.

Alternativa o adicionalmente, puede ser útil para combinar las modificaciones de aminoácidos anteriores con una o más de las modificaciones de aminoácidos adicionales que alteran la unión C1q y/o la función de citotoxicidad dependiente de complemento de la región Fc.

El polipéptido de partida de particular interés de la presente invención es habitualmente el que se une a C1q y muestra una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácidos adicionales descritas en la presente invención servirán en general para alterar la capacidad del polipéptido de partida para unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y, preferiblemente, abolir estas funciones efectoras. Sin embargo, en la presente invención se consideran los polipéptidos que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con una unión a C1q mejorada y/o una función de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mejoradas. Por ejemplo, el polipéptido de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar la CDC y puede modificarse según los conocimientos de la presente invención, de manera que adquiere estas funciones efectoras adicionales. Además, los polipéptidos con actividad de unión a C1q preexistente, que opcionalmente presentan además la capacidad de mediar la CDC, se pueden modificar, de manera que se potencian una o ambas de estas actividades.

Para generar una región Fc con una unión a C1q y/o función de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas, las posiciones de aminoácidos a modificar se seleccionan generalmente de las posiciones de cadena pesada 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 y 334, donde la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, sólo una de las ocho posiciones identificadas anteriormente se altera con el fin de generar la región variante del polipéptido con la unión a C1q y/o función de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas. Preferiblemente, sólo se altera el residuo 2790, 329 ó 322 si éste es el caso. Alternativamente, se modifican dos o más de las posiciones identificadas anteriormente. Si se

ES 2 326 964 T3

combinan las sustituciones, generalmente se combinan las sustituciones que aumentan la unión a C1q humana (por ejemplo, en las posiciones de residuos 326, 327, 333 y 334) o aquellas que disminuyen la unión a C1q humana (por ejemplo, en las posiciones de residuos 270, 322, 329 y 331). En la última realización, se pueden sustituir las cuatro posiciones (es decir, 270, 322, 329 y 331). Preferiblemente, se combinan sustituciones adicionales en dos, tres o todas las posiciones 326, 327, 333 ó 334, opcionalmente con otras sustituciones de la región Fc, para generar un polipéptido con unión a C1q humana mejorada y preferiblemente actividad CDC *in vitro* o *in vivo* mejoradas.

La prolina se conserva en la posición 329 en las IgG humanas. Este residuo se sustituye preferiblemente por alanina, aunque se contempla la sustitución por cualquier otro aminoácido, por ejemplo, serina, treonina, asparagina, glicina o valina.

La prolina se conserva en la posición 331 en IgG1, IgG2 e IgG3 humanas, pero no en IgG4 (que presenta un residuo de serina en la posición 331). El residuo 331 se sustituye preferiblemente por alanina u otro aminoácido, por ejemplo, serina (para regiones de IgG diferentes de IgG4), glicina o valina.

La lisina 322 se conserva en IgGs humanas y este residuo se sustituye preferiblemente por un residuo de alanina, pero se contempla la sustitución por cualquier otro residuo de aminoácido, por ejemplo, serina, treonina, glicina o valina.

D270 se conserva en IgGs humanas y este residuo se puede sustituir por otro residuo de aminoácido, por ejemplo, alanina, serina, treonina, glicina, valina o lisina.

K326 también se conserva en IgGs humanas. Este residuo se puede sustituir por otro residuo incluyendo, pero sin limitación, valina, ácido glutámico, alanina, glicina, ácido aspártico, metionina o triptófano, siendo triptófano el preferido.

Asimismo, E333 también se conserva en IgGs humanas. E333 se sustituye preferiblemente por un residuo de aminoácido con una columna de cadena lateral más pequeña, tal como valina, glicina, alanina o serina, siendo serina preferida.

K334 se conserva en IgGs humanas y se puede sustituir por otro residuo, tal como alanina u otro residuo.

En IgG1 e IgG3 humanas, el residuo 327 es una alanina. Con el fin de generar una variante con unión a C1q mejorada, esta alanina se puede sustituir por otro residuo, tal como glicina. En IgG2 e IgG4, el residuo 327 es una glicina y ésta se puede sustituir por alanina (u otro residuo) para disminuir la unión a C1q.

Tal como se ha descrito anteriormente, se puede diseñar una región Fc con una función efectora alterada, por ejemplo, mediante la modificación de la unión a C1q y/o la unión a FcR y, de este modo, cambiando la actividad CDC y/o actividad ADCC. Por ejemplo, se puede generar una región Fc variante con unión a C1q mejorada y unión a FcγRIII mejorada; por ejemplo, que presente tanto actividad ADCC mejorada como actividad CDC mejorada. Alternativamente, cuando se desea que la función efectora se reduzca o elimine, se puede modificar sólo una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, por ejemplo, para generar una variante de la región Fc con actividad ADCC mejorada, pero actividad CDC reducida y viceversa.

Con respecto a las alteraciones adicionales de secuencias de aminoácidos, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta de la variante de polipéptido también se puede sustituir, generalmente, por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamiento aberrante.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos sirve para alterar el patrón de glicosilación del polipéptido. Esto puede conseguirse mediante la eliminación de uno o más restos de carbohidrato que se hallan en el polipéptido y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido. La glicosilación de polipéptidos se produce normalmente a través de unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al polipéptido se realiza convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido original (para los sitios de glicosilación unidos a O). Una variante de glicosilación de ejemplo presenta una sustitución de aminoácido del residuo Asn297 de la cadena pesada.

Además, la clase, subclase o alotipo de la región Fc se pueden alterar mediante una o más sustituciones de aminoácidos adicionales para generar una región Fc con una secuencia de aminoácidos más homóloga a una clase, subclase o alotipo diferentes según se desee. Por ejemplo, se puede alterar una región Fc murina para generar una secuencia de aminoácidos más homóloga a una región Fc humana; se puede modificar una región Fc de IgG de alotipo no-A humana

para conseguir una región Fc de IgG1 de alotipo A humana, etc. En una realización, la modificación o modificaciones de aminoácidos de la presente invención que alteran la unión a FcR y/o actividad ADCC se realizan en el dominio CH2 de la región Fc y el dominio CH3 se elimina o sustituye por otro dominio de dimerización. Preferiblemente, sin embargo, el dominio CH3 se mantiene (aparte de las modificaciones de aminoácidos en los mismos que alteran la función efectora tal como se describe en la presente invención).

La glicoproteína preparada tal como se ha descrito anteriormente se puede someter a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso pretendido de la glicoproteína. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o eliminación de residuos de aminoácidos), fusión a polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos sirve para alterar el patrón de glicosilación de la glicoproteína. Dichas variaciones de la glicosilación pueden ser adicionales a la variación de la glicosilación con respecto a la falta de glucosa descrita en la presente invención y se pueden conseguir mediante la eliminación de uno o más grupos carbohidratos que se encuentran en la glicoproteína, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la glicoproteína. La glicosilación de las glicoproteínas es habitualmente por unión a N o por unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en una glicoproteína crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación a la glicoproteína se realiza de manera conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación por unión a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de la glicoproteína original (para los sitios de glicosilación por unión a O).

B. Cribado de actividad biológica

La variante de glicoproteína se puede someter a uno o más ensayos para evaluar cualquier cambio en la actividad biológica en comparación con el polipéptido de partida.

Preferiblemente, la variante de glicoproteína mantiene esencialmente la capacidad de unirse a antígeno en comparación con el polipéptido no variante, es decir, la capacidad de unión no es peor que aproximadamente 20 veces, por ejemplo, no pero de aproximadamente 5 veces la del polipéptido no variante. La capacidad de unión de la variante del polipéptido se puede determinar utilizando técnicas, tales como análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA), por ejemplo.

Se puede evaluar la capacidad de la variante de la glicoproteína para unirse a un FcR. Cuando el FcR es un receptor de Fc de alta afinidad, tal como FcγRI, FcRn, FcγRIIB o FcγRIIA, la unión se puede medir ajustando la variante de glicoproteína monomérica y midiendo la variante de glicoproteína unida usando un anticuerpo que específicamente se une a la variante de glicoproteína en un formato ELISA estándar (ver Ejemplos a continuación). Otro ensayo de unión a FcR para los FcRs de afinidad baja se describe en WO00/42072 (Presta) y la Patente de Estados Unidos No.6.242.195B1.

Para evaluar la actividad de ADCC de la variante de glicoproteína, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro* usando proporciones variables de efector: diana. Las “células efectoras” útiles para dichos análisis incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la variante de glicoproteína se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes *et al.* PNAS (EU) 95:652-656 (1998).

Se puede evaluar la capacidad de la variante para unirse a C1q y mediar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Para determinar la unión a C1q se puede realizar un ELISA de unión a C1q. En resumen, las placas de ensayo se pueden ser recubrir durante la noche a 4°C con la variante de glicoproteína o el polipéptido de partida (control) en tampón de recubrimiento. A continuación, las placas se pueden lavar y bloquear. Después de un lavado, se puede añadir una alícuota de C1q humano a cada pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado adicional, se pueden añadir 100 μl de un anticuerpo conjugado con peroxidasa de C1q anti-complemento de oveja a cada pocillo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se puede lavar de nuevo con un tampón de lavado y se pueden añadir a cada pocillo 100 μl del sustrato tampón que contiene OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma)). La reacción de oxidación, observada por la aparición del color amarillo, puede continuar 30 minutos y parar al añadir 100 μl de H₂SO₄ 4,5 N. A continuación, se puede leer la absorbancia a (492-405) nm.

Una variante de glicoproteína de ejemplo es la que muestra “una reducción significativa en la unión a C1q” en este ensayo. Eso significa que aproximadamente 100 μg/ml de la variante de glicoproteína muestra una reducción de aproximadamente 50 veces o más en la unión a C1q en comparación con 100 μg/ml de un anticuerpo de control que

tiene una región Fc de IgG1 no mutada. En la realización más preferida, la variante de glicoproteína “no se une a C1q”, es decir, 100 $\mu\text{g/ml}$ de la variante de glicoproteína muestra la reducción en aproximadamente 100 veces o más de la unión a C1q en comparación con 100 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de control.

5 Otra variante de ejemplo es uno que “tiene una mejor afinidad de unión a C1q humano que el polipéptido parental”. Dicha molécula puede mostrar, por ejemplo, una mejora de aproximadamente 2 veces o más, y preferiblemente, de aproximadamente cinco veces o más, en la unión a C1q humano en comparación con el polipéptido parental (por ejemplo, en los valores de IC_{50} de estas dos moléculas). Por ejemplo, la unión a C1q humano se puede mejorar en aproximadamente de dos veces a 500 veces, y preferiblemente, desde aproximadamente dos veces o desde aproximadamente cinco veces hasta 1000 veces en comparación con el polipéptido parental.

Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996). En resumen, se pueden diluir con tampón varias concentraciones de la variante de glicoproteína y complemento humano. 15 Las células que expresan el antígeno al que se une la variante de glicoproteína se pueden diluir hasta una densidad de $\sim 1 \times 10^6$ células/ml. Las mezclas de variante de glicoproteína, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno se pueden añadir a una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con base plana y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C y CO_2 al 5% para facilitar la lisis celular mediada por complemento. A continuación, se pueden añadir 50 μl de azul alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubar durante toda la noche a 37°C. La absorbancia se mide utilizando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados se pueden expresar en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de la muestra se pueden computar a partir de una curva estándar y se indica el porcentaje de actividad en comparación con el polipéptido no variante para la variante de glicoproteína de interés.

25 Otra variante de ejemplo “no activa el complemento”. Por ejemplo, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de la variante de glicoproteína muestra aproximadamente un 0-10% de actividad CDC en este ensayo en comparación con 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo de control que tiene una región Fc de IgG1 no mutada. Preferiblemente, la variante no parece tener ninguna actividad CDC en el ensayo CDC anterior.

30 La glicoproteína puede ser aquella que muestra mayor CDC en comparación con un polipéptido parental, por ejemplo, que muestra una mejora de aproximadamente de dos veces a aproximadamente 100 veces en la actividad CDC *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, comparando los valores IC_{50} para cada molécula).

También se contemplan aquí variantes de la región Fc con afinidad de unión alterada para el receptor neonatal (FcRn). Se anticipa que las variantes de la región Fc con mejor afinidad por FcRn presentan una vida media en suero más larga, y dichas moléculas tendrán aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una vida media larga de la glicoproteína administrada, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico. En cambio, se espera que las variantes de la región Fc con una menor afinidad de unión a FcRn tengan una vida media más corta, y dichas moléculas se pueden administrar, por ejemplo, a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, por ejemplo, para la toma de imágenes de diagnóstico *in vivo* o para polipéptidos que presentan efectos secundarios tóxicos cuando se detiene la circulación en la corriente sanguínea durante periodos largos de tiempo, etc. Se anticipa que las variantes de la región Fc con menor afinidad de unión a FcRn con menor probabilidad atraviesan la placenta y, de este modo, se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

45 C. Preparación de anticuerpos

En la realización preferida de la presente invención, la glicoproteína que se modifica según la técnica de la presente invención es un anticuerpo. Las técnicas para producir anticuerpos son las siguientes:

50 (i) Selección y preparación de antígenos

Cuando la glicoproteína es un anticuerpo, está dirigido contra un anticuerpo de interés. Preferiblemente, el antígeno es una glicoproteína biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece de una enfermedad o trastorno puede dar lugar a un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se consideran los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumor; véase, la Patente de Estados Unidos 5.091.178).

60 Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Entre los antígenos se incluyen moléculas, tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humano y hormona de crecimiento bovino; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIC, factor IX, factor tisular (TF) y factor von Willebrands; factores anticoagulantes, tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo de pulmón; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tejido (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoietico; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalina; RANTES (regulada por activación de células T normalmente expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de

macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína a o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado óseo (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4, neurotrofina-5 o neurotrofina-6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento de nervioso, tal como NGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; un factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- α o TNF- β ; factor I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, interferón-beta e interferón-gamma; factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 e IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerante de la descomposición, antígeno viral, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura de SIDA; proteínas de transporte; receptores de retorno ("homing"); adreínas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como receptor HER2, HER3 ó HER4; y fragmentos de cualquier de los polipéptidos indicados anteriormente.

Las dianas moleculares para anticuerpos de ejemplo comprendidas por la presente invención incluyen proteínas CD, tales como CD3, CD4, Cd8, CD19, CD20, CD22, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; antígeno de células madre de próstata (PSCA); moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina α 4/ β 7 e integrina α v/ β 3 incluyendo las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; factor tisular (TF); un factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- α o TNF- β , interferón alfa (α -IFN); una interleuquina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, etc.

Se pueden utilizar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden utilizar fragmentos de éstos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógenos. Alternativamente, las células que expresan la molécula transmembrana se pueden utilizar como inmunógeno. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células de cáncer) o pueden ser células que han sido transformadas por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

(ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg ó 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se reforzaron con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. Siete a 14 días más tarde los animales sangraron y se analizó la titulación de anticuerpos en suero. Los animales se reforzaron hasta un nivel constante de titulación. Preferiblemente, el animal se reforzó con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjugó a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden fabricar en un cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como alumbre, son utilizados de manera adecuada para aumentar la respuesta inmune.

(iii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se puede fabricar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, es inmunizado tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células

de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se cultivan y desarrollan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de mieloma preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, apoyan una producción estable de anticuerpos a nivel elevado por las células productoras de anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y las células SP-2 o X63-Ag8-653 de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano se han descrito también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas, 51-63 Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)).

Se analiza el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar de manera adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle a continuación.

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango nM) mediante el intercambio de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina.

Habitualmente, dichos polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que presenta especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que presenta especificidad por un antígeno diferente.

(iv) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos “importados”, que se adquieren habitualmente de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante reducir la antigenicidad. Según el denominado método de “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominios variables humanos conocidas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor se acepta a continuación como el estructura (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un estructura particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanos diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen manteniendo la afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El examen de estas observaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDDR están directamente y mayoritariamente sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) a la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulinas de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación de los antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1983); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom *et al.*, *J. mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Vaughan *et al.*, *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

(v) *Anticuerpos multiespecíficos*

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente sólo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos triespecíficos, están comprendidos por esta expresión cuando se utilizan en la presente invención. Entre los ejemplos de BsAbs se incluyen aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de células tumorales y el otro brazo dirigido contra una molécula desencadenante citotóxica, tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligno (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de célula renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión de células neuronales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a carcinoma *pan* (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina, tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/antisaporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena a de ricina, anti-interferon-α (IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-vinca alcaloide; BsAbs para profármacos activados por enzimas, tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión de profármaco mitomicina fosfato a mitomicina alcohol); BsAbs que se pueden utilizar como agentes fibrinolíticos, tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tejido (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunes a los receptores de la superficie celu-

lar, tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor de Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para su uso en terapia de enfermedades infecciosas, tales como anti-CD3/anti-virus de herpes simplex (HSV), anti-complejo receptor de células T:CD3/anti-gripe, anti-FcγR/anti-VIH; BsAbs para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo*, tal como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacuna; y BsAbs como herramientas de diagnóstico, tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Ente los ejemplos de anticuerpos triespecíficos se incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Los anticuerpos biespecíficos se revisan en Segal *et al.* J. Immunol. Methods 248: 1-6 (2001).

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. En WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por los menos parte de la bisagra, CH2 y regiones CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen una particular importancia.

En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo sencillo de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986). Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/300373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

(vi) Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante la expresión por la célula de un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes a la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de áci-

do nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido comprende aquí (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadenas o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadenas o cadenas polipeptídicas puede comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas puede comprender: VH-CH1-enlazador flexible-vH-CH1-cadena de región Fc, o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende además preferiblemente por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprender un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL. Los anticuerpos multivalentes se describen en WO 01/00238 y WO 00/44788.

(vii) *Anticuerpos madurados por afinidad*

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo madurado por afinidad que comprende la sustitución o sustituciones de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior presentarán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental a partir del que se generan. Una manera práctica para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la exposición a fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se exponen de una manera monovalente a partir de partículas filamentosas de fagos como fusiones al producto génico III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes expuestas en fagos se criban a continuación según su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y su antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado y se pueden seleccionar para el posterior desarrollo anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes.

(viii) *Inmunoconjugados*

La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden la glicoproteína conjugada a un agente anti-canceroso, tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente.

También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC 1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

En una realización preferida, la glicoproteína de la presente invención se conjuga a una o más moléculas maitansinoides.

Los conjugados glicoproteína-maitansinoide se pueden preparar mediante la unión química de la glicoproteína (por ejemplo, un anticuerpo) a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de la glicoproteína o la molécula de maitansinoide. Se ha observado que un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugados por molécula de anticuerpo son eficaces en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentarían la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.208.020. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol. Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para fabricar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente de Estados Unidos No. 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptídica lábiles, o grupos esterasa lábiles, tal como se han descrito en las patentes anteriores, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden fabricar utilizando una serie de genes acopladores de proteínas

bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), esters activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de la unión. Por ejemplo, una unión éster se puede formar mediante la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. A reacción puede tener lugar en la posición c-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, la unión se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Otro inmunoconjugado de interés comprende la glicoproteína conjugada a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de de antibióticos de caliqueamicina son capaces de producir roturas de ADN de doble cadena en concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todos de American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ^I (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 [1993] y LODE *et al.* Cancer Research 58: 2925-2928 [1998] y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que se puede conjugar la glicoproteína es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA presentan sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a las glicoproteínas de la presente invención incluyen BCNU, estreptofoína, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos No. 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención se refiere además a un inmunoconjugado formado entre la glicoproteína y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , U^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centelleográficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la toma de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El ytrio 90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados de la glicoproteína y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la

liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Cari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 [1992]).

5 Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende la glicoproteína y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifica las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

10 En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el reconocimiento de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

15 (ix) *Terapia de profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpo (ADEPT)*

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) a un fármaco anticancerígeno activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

El componente enzimático del inmunconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

25 Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serrata proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación del abzima a una población de células tumorales.

40 Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

(x) *Otras modificaciones de glicoproteínas*

50 En la presente invención se contemplan otras modificaciones de la glicoproteína. Por ejemplo, la glicoproteína se puede unir a uno de un conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de liberación de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

60 Las glicoproteínas descritas en la presente invención también se pueden formular como liposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que son útiles para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos nos. 4.485.045 y 4.544.545 y WO97/38731, publicada el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se puede conjugar a los liposomas tal como se describen en Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente en el liposoma está contenido un agente quimioterapéutico. Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81 (19)1484 (1989).

(xi) *Anticuerpos de ejemplo*

Los anticuerpos preferidos en el alcance de la presente invención incluyen aquellos que comprenden las secuencias de aminoácidos de los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos anti-HER2 que incluyen anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera de huMAb 4D5-8 (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992), Patente de Estados Unidos No. 5.725.856);

Anticuerpos anti-CD20 tales como "CDB8" anti-CD20 quiméricos como en la Patente de Estados Unidos No. 5.736.137 (RITUXAN®), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la Patente de Estados Unidos No. 5.721.108, B1 o Tositumomab (BEXXAR®);

anti-IL-8 (St John *et al.*, Chest, 103: 932 (1993), y la Publicación Internacional No. WO 95/23865);

anticuerpos anti-VEGF incluyendo anticuerpos humanizados y/o anticuerpos anti-VEGF madurados por afinidad, tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTINT™ (Kim *et al.*, Growth Factors, 7: 53-64 (1992), Publicación Internacional No. WO 96/30046, y WO 98/45331, publicada el 15 de octubre de 1998);

anticuerpos anti-PSCA (WO01/40309);

anticuerpos anti-CD40, incluyendo variantes S2C6 humanizadas de los mismos (WO00/75348);

anti-CD11a (Patente de Estados Unidos No. 5.622.700, WO 98/23761, Steppe *et al.*, Transplant Intl. 4: 3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, Transplantation 58: 377-380 (1994)); anti-IgE (Presta *et al.*, J. Immunol. 151: 2623-2632 (1993), y Publicación Internacional No. WO 95/19181; Patente de Estados Unidos No. 5.714.338, concedida el 3 de febrero de 1998 o la Patente de Estados Unidos No. 5.091.313, concedida el 25 de febrero de 1992, WO 93/04173 publicada el 4 de marzo de 1993, o WO 99/01556 publicada el 14 de enero de 1999, Patente de Estados Unidos No. 5.714.338);

anti-CD18 (Patente de Estados Unidos No. 5.622.700, publicada el 22 de abril de 1997, o como en WO 97/26912, publicada el 31 de julio de 1997);

anticuerpo anti-receptor Apo-2 (WO 98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998);

anticuerpos anti-TNF- α incluyendo cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (Véase, Patente de Estados Unidos No. 5.672.347 concedida el 30 de septiembre de 1997, Lorenz *et al.* J. Immunol. 156 (4): 1646-1653 (1996), y Dhainaut *et al.* Crit. Care Med. 23 (9): 1461-1469 (1995));

anti-Factor tisular (TF) (Patente Europea No. 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994);

anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ humana (WO 98/06248 publicada el 19 de febrero de 1998);

anti-EGFR (anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en WO 96/40210 publicada el 19 de diciembre de 1996);

anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (Patente de Estados Unidos No. 4.515.893 concedida el 7 de mayo de 1985);

anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (Véase Patente de Estados Unidos No. 5.693.762 concedida el 2 de diciembre de 1997);

anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.* Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)); anticuerpo anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann *et al.* Nature 332: 323-337 (1988);

anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano *et al.* J. Immunol. 155 (10): 4996-5002 (1995);

anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey *et al.* Cancer Res. 55 (23Suppl): 5935s-5945s (1995);

ES 2 326 964 T3

anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.* Cancer Res. 55 (23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.* Cancer Res. 55 (23 Suppl): 5916s-5920s (1995));

anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon, tal como C242 (Litton *et al.* Eur J. Immunol. 26 (1): 1-9 (1996));

anticuerpos anti-CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis *et al.* J. Immunol. 155 (2): 925-937 (1995));

anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.* Cancer Res 55 (23 Suppl): 5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771;

anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid *et al.* Cancer Res 55 (23 Suppl): 5899s-5907s (1995);

anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®);

anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o Fab c7E3 (REOPRO®);

anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®);

anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®;

anticuerpos anti-VIH tales como PRO542;

anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®;

anticuerpo anti-CA 125 OvaRex;

anticuerpo de anti-epítipo GD3 idiotípico BEC2;

anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ VITAMIN®;

anticuerpo anti-carcinoma de células renales humanas tales como ch-G250; ING-1;

anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94);

anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33);

anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3;

anticuerpos anti-carcinoma de célula escamosa humana (SF-25); y

anticuerpo anti-antígeno de leucocito humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR On-colym (Lym-1).

Aunque la glicoproteína de interés aquí es preferiblemente un anticuerpo, se contemplan otras glicoproteínas que contienen la región Fc que se pueden modificar según los métodos descritos aquí. Un ejemplo de dicha molécula es una inmunoadhesina.

D. Preparación de Inmunoadhesinas

El diseño de inmunoadhesinas más simple y sencillo combina el dominio o dominios de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará por el extremo C terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N terminal de una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina, aunque las fusiones N-terminales también son posibles.

Habitualmente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado mantendrá por lo menos los dominios bisagra, dominios C_H2 y C_H3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan al extremo C terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al C_H1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios concretos y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, la secreción, o características de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona al extremo N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar la región constante de cadena pesada completa con la secuencia de

adhesina. Sin embargo, más preferiblemente, en la fusión se utiliza una secuencia que empieza en la región bisagra justo corriente arriba del sitio de división por papaína que define químicamente Fc de IgG (es decir, el residuo 216, tomando como el primer residuo de la región constante de cadena pesada el 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de la adhesina se fusiona a (a) la región bisagra y C_H2 y C_H3 o (b) los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3, de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más elevado; IgM existe generalmente como un pentámero de cuatro unidades básicas que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser la misma o diferente.

A continuación, se muestran esquemáticamente varias inmunoadhesinas ensambladas de ejemplo dentro del alcance de la presente invención:

(a) AC_L-AC_L;

(b) AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-ACH);

(c) AC_LAC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-ACH, o V_LC_LV_HC_H)

(d) AC_L-V_HC_H-(AC_H, o AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-AC_H);

(e) V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-AC_H); y

(f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina iguales o diferentes;

V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero superior a 1;

Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

Por brevedad, las estructuras anteriores sólo muestran características claves; no indican los dominios de unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando se necesiten dichos dominios para la actividad de unión, se interpretará que están presentes en las posiciones habituales que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Alternativamente, las secuencias de adhesina se pueden insertar entre las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, entre el dominio bisagra y el dominio C_H2, o entre los dominios C_H2 y C_H3. Se han descrito construcciones similares por Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol. 28: 1027-1037 (1991).

Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es necesaria en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina, o directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa habitualmente con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, el híbrido de cadena pesada y cadena ligera se asociará covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidas por enlaces disulfuro. Los procedimientos adecuados para la preparación de dichas estructuras se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567 concedida el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen de manera más conveniente mediante la fusión de la secuencia de ADNc que codifica la parte de adhesina en el marco de lectura a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también se puede utilizar la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Aruffo *et al.*,

Cell 61: 1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.*, Cell 66: 1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNcs que codifican las regiones constantes de cadena pesada de IgG se pueden aislar en base a secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos de bazo o sangre periférica, mediante técnicas de hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNcs que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmidico que dirige la expresión eficaz en las células huésped elegidas.

E. Vectores, células huésped y métodos recombinantes

La presente invención proporciona ácido nucleico aislado que codifica una glicoproteína tal como se describe en la presente invención, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de la glicoproteína.

Para la producción recombinante de la glicoproteína, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en el vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica la glicoproteína se aísla fácilmente y se secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican la glicoproteína). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

La glicoproteína de la presente invención se puede producir recombinantemente, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, es dividida mediante una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido nativo, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal natural puede ser sustituida por, por ejemplo, la secuencia líder de la invertasa de levadura, la secuencia líder del factor α (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, están disponibles las secuencias señal de mamífero, así como las secuencias líder secretoras virales, por ejemplo, la señal de herpes simplex gD.

El ADN para dicha región precursora está unida en el marco de lectura al ADN que codifica el polipéptido.

(ii) Componente origen de replicación

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia es la que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el componente origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente gen de selección

Los vectores de clonación y expresión pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo expresan una proteína que confiere resistencia al fármaco y, de este modo, sobreviven a la pauta de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico para el polipéptido, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen la DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el polipéptido, la proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase, la Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un medio adecuado para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38.626) están complementadas por plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 se pueden utilizar para la transformación de levaduras de Kluyveromyces. Alternativamente, se describió un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K. lactis*. Van der Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han descrito vectores de expresión estables con múltiples copias para la secreción de albúmina de suero humano recombinante maduro por cepas industriales de Kluyveromyces. Fleer *et al.*, Bio/Technology 9:968-975 (1991).

(iv) Componente promotor

Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del polipéptido. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido.

Las secuencias de promotores son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes de eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes de eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafofato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se utilizan de manera ventajosa con promotores de levadura.

La transcripción de polipéptidos a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y más preferiblemente el virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de manera conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano se obtiene de manera conveniente como un fragmento de restricción *HindIII* E. Greenaway *et al.*, Gene, 18: 355-360 (1982). En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase, Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) en la expresión de ADNc para β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de

timidina quinasa del virus del herpes simples. Alternativamente, se puede utilizar como promotor la repetición larga terminal del virus del sarcoma de rous.

(v) *Componente elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) en elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) *Componente terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

Las células huésped adecuadas para la donación o expresión de los vectores de la presente invención son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Entre las procariotas adecuadas se incluyen eubacterias, tales como organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *Escherichia*, por ejemplo, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. Subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P descrita en DD 266.710 publicado 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. Aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped para clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores de codificación de polipéptidos. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el microorganismo huésped eucariota inferior más habitualmente utilizado. Sin embargo, un conjunto de otros géneros, especies y cepas están disponibles habitualmente y se utilizan en la presente invención, tales como *Schizosaccharomyces Pombe*, huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waitii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*, *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244.234), *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptido glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Un conjunto de dichas cepas virales para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV, y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar aquí como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, ha habido un mayor interés en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivos de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Algunos ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de células de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en el cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); células de sertolli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano

(HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; células de mieloma de ratón, tales como NSO (por ejemplo, RCB0213, Bebbington *et al.* Rio/Technology 10: 169 (1992)) y células SP2/0 (por ejemplo, células SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581); células de mieloma de rata, tales como células YB2/0 (por ejemplo, células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, ATCC CRL 1662); y una línea de hematoma humano (Hep G2). Las células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) son una línea celular preferida para realizar la invención con CHOK1, DUX-B11, CHO-DP12, CHO-DG44 (Urlaub *et al.*, Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555 (1986)), siendo Lec 13 líneas de células huésped CHO de ejemplo.

10 Las células DUX-B11 se han transfectado con un pSVEHIGNeo que porta el ADNc para preproinsulina, generando de este modo el clon CHO-DP12. En el caso de células huésped CHO-K1 (ATCC CRL 61), DUX-B11 (Simonsen *et al.* PNAS (USA) 80: 2495-2499 (1983)), DG44 o CHO-DP12, se pueden alterar de manera que son deficientes en su capacidad en su capacidad para fucosilar proteínas expresadas en las mismas.

15 La presente invención también es aplicable a células de hibridoma. El término “hibridoma” se refiere a una línea celular híbrida producida por la fusión de una línea celular inmortal de origen inmunológico y una célula productora de anticuerpos. El término comprende la progenie de fusiones de mieloma heterohíbridas que son el resultado de una fusión con células humanas y una línea de células de mieloma murina fusionada posteriormente a una célula plasmática, conocida habitualmente como línea celular trioma. Además, el término pretende incluir cualquier línea

20 celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos, tales como, por ejemplo, cuadromas (Véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, Nature 537: 3053 (1983)). Las líneas células híbridas pueden ser de cualquier especie, incluyendo humano y ratón.

En una realización más preferida, la célula de mamífero es una célula de mamífero no hibridoma que ha sido transformada con ácido nucleico aislado exógeno que codifica el polipéptido de interés. Por “ácido nucleico exógeno” o “ácido nucleico heterólogo” se entiende una secuencia de ácidos nucleicos que es extraña a la célula, u homóloga a la célula, pero en una posición en el ácido nucleico de la célula huésped en el que el ácido nucleico no es encuentra habitualmente.

30 (viii) Cultivo de células huésped

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptidos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes o la amplificación de los genes que codifican las secuencias

35 deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir el polipéptido de la presente invención se pueden cultivar en una serie de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58, 44 (1979); Baines *et al.*, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), Patente de Estados Unidos No. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195 o la Patente de Estados Unidos Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico),

45 sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), soluciones tampón (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GentamicinaTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales a nivel micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura,

50 pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán obvias para un técnico en la materia.

Todos los medios de cultivo proporcionan habitualmente por lo menos un componente de una o más de las siguientes categorías:

- 55 1) una fuente de energía, habitualmente en forma de un carbohidrato, tal como glucosa;
- 2) todos los aminoácidos esenciales, y normalmente el grupo básico de veinte aminoácidos más cistina;
- 60 3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones,
- 4) ácidos grasos libres; y
- 5) elementos traza, donde los elementos traza se definen como compuestos inorgánicos o elementos naturales que
- 65 son requeridos habitualmente en concentraciones muy bajas, normalmente en el intervalo micromolar.

El medio de cultivo está preferiblemente libre de suero, por ejemplo, menos de aproximadamente un 5%, preferiblemente menos de un 1%, más preferiblemente de 0 a 0,1% de suero, y otras proteínas derivadas de animales. Sin embargo, se pueden utilizar si se desea. En una realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo celular comprende un exceso de aminoácidos. Los aminoácidos que se proporcionan en exceso se pueden seleccionar, por ejemplo, de Asn, Asp, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. Preferiblemente, se proporcionan en exceso Asn, Asp, Lys, Met, Ser y Trp. Por ejemplo, se pueden utilizar aminoácidos, vitaminas, elementos traza y otros componentes del medio en una o dos veces los intervalos especificados en la Patente Europea EO 307.247 o la Patente de Estados Unidos No. 6.180.401. Estos dos documentos se incorporan por referencia en la presente invención.

Para el cultivo de las células de mamífero que expresan la proteína deseada y son capaces de añadir los carbohidratos deseados en posiciones específicas, se pueden utilizar numerosas condiciones de cultivo prestando una atención particular a la célula huésped que se cultiva. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero son conocidas en la técnica (Cleveland *et al.*, J. Immunol. Methods 56:221-234 (1983)) o se puede determinar fácilmente por el técnico (véase, por ejemplo, Animal Cell Culture. A Practical Approach 2nd Ed., Rickwood, D y Hames, B.D. eds. Oxford University Press, Nueva York (1992)), y varían según la célula huésped particular seleccionada.

(ix) Purificación de glicoproteínas

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la glicoproteína se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o se secreta directamente en el medio. Si la glicoproteína se produce intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los residuos particulados, células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando se secreta la glicoproteína al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, se puede incluir un inhibidor de proteasa de unidad A de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir anticuerpos para evitar el crecimiento de contaminantes extraños.

La composición de glicoproteínas preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que está presente en la glicoproteína. La proteína A se puede utilizar para purificar glicoproteínas que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando la glicoproteína comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSETM, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo de la glicoproteína a recuperar.

En una realización, la glicoproteína se puede purificar utilizando adsorción sobre un sustrato de lectinas (por ejemplo, una columna de afinidad de lectinas) para eliminar la glicoproteína que contenía fucosa de la preparación y, de este modo, enriquece la glicoproteína sin fucosa.

F. Análisis de la glicoproteína

La parte compleja de carbohidrato de la glicoproteína producida mediante los procesos de la presente invención se pueden analizar fácilmente para determinar que la reacción de glicosilación descrita anteriormente es completa. Los oligosacáridos se analizan mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos. De este modo, por ejemplo, técnicas tales como la transferencia de lectinas, conocidas en la técnica, revelan proporciones de manosa terminal u otros azúcares, tales como galactosa.

Preferiblemente, se analizan los carbohidratos mediante análisis espectral de masas MALDI-TOF tal como en el Ejemplo 1 siguiente y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Se conocen varios métodos en la técnica para el análisis de la glicosilación y son útiles en el contexto de la presente invención. Dichos métodos proporcionan información con respecto a la identidad y la composición del oligosacárido unido al péptido. Los métodos para el análisis de carbohidratos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cromatografía con lectina; HPAEC-PAD, que utiliza cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado para separar oligosacáridos en base a la carga; RMN; espectrometría de masas; HPLC; GPC; análisis composicional de monosacáridos; digestión enzimática secuencial.

Adicionalmente, se conocen métodos para liberar oligosacáridos. Estos métodos incluyen:

- 1) enzimáticos, por ejemplo, utilizando fucosidasa, tal como α -L-fucosidasa para eliminar fucosidasa.
- 2) eliminación que utiliza un medio alcalino fuerte para liberar principalmente estructuras unidas a O; y
- 3) métodos químicos que utilizan hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos unidos a N y unidos a O.

Los azúcares neutros y amino azúcares se pueden determinar mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento combinado con detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD Carbohydrate System, Dionex Corp.). Por ejemplo, los azúcares se pueden liberar mediante hidrólisis en ácido trifluoroacético al 20% (v/v) a 100°C durante 6 horas. A continuación, los hidrolisatos se secan mediante liofilización o con un Speed Vac (Savant Instruments). A continuación, los residuos se disuelven en una solución de acetato sódico trihidratado al 1% y se analiza en una columna HPLC-As6 tal como se describe por Anumula *et al.* Anal. Biochem. 195: 269-280 (1991).

El ácido siálico se puede determinar por separado mediante el método colorimétrico directo de Yao *et al.*, Anal. Biochem. 179: 332-335 (1989)) en muestras por triplicado. En una realización preferida, se utiliza el ácido tiobarbitúrico (TBA) de Warren, L. J. Biol. Chem. 238: (8) (1959).

Alternativamente, se puede realizar el análisis de carbohidratos por inmunotransferencia. Según este procedimiento, se detectan los carbohidratos unidos a proteína utilizando un sistema de detección comercial de glicanos (Boehringer) que se basa en el procedimiento de inmunotransferencia oxidativa descrito por Haselbeck y Hosel (Haselbeck *et al.* Glycoconjugate J., 7:63 (1990)).

Los métodos de análisis incluyen aquellos descritos para el análisis de oligosacáridos asociados a anticuerpo y descritos en, por ejemplo, Wormald *et al.*, Biochem. 36: 1370-1380 (1997); Sheeley *et al.*, Anal. Biochem. 247: 102-110 (1997) y Cant *et al.*, Cytotechnology 25:223-228, así como las referencias citadas en las mismas.

30 G. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de la glicoproteína se pueden preparar mezclando la glicoproteína que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables, con excipientes o con estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no han de ser tóxicos para el receptor en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el alcohol fenólico, butílico o benzílico; los alquil parabenos tales como el metil o propil parabeno; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina, o las inmunoglobulinas; los polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; los aminoácidos como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina, o la lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contraiones formadores de sales tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o el polietilenglicol (PEG).

La formulación aquí descrita también puede contener más de un compuesto activo si es necesario para la afección en particular que vaya a ser tratada, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten de forma adversa entre sí. Por ejemplo, la composición puede comprender además otro anticuerpo o un agente quimioterapéutico. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

Los ingredientes activos pueden también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de liberación de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen la glicoproteína, cuyas matrices están en forma de artículos con formas determinadas, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico-

co degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el de ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que se traduce en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Deben idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través de un intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos sulfhidrilos, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas de matrices poliméricas.

La composición farmacéutica se puede liofilizar. Las formulaciones de anticuerpos liofilizados se describen en la Patente de Estados Unidos No. 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosos estables se describen en la Patente de Estados Unidos No. 6.171.586 B1.

H. Usos no terapéuticos de la glicoproteína

La glicoproteína de la presente invención se puede utilizar como un agente de purificación por afinidad. En este proceso, la glicoproteína se inmoviliza en una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. La glicoproteína inmovilizada se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar y, a continuación, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del antígeno a purificar, que está unido a la glicoproteína inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la glicoproteína.

La glicoproteína también puede ser útil en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específico.

Para aplicaciones de diagnóstico, la glicoproteína se marcará habitualmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. La glicoproteína se puede marcar con el radioisótopo utilizando técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991), por ejemplo, y se puede medir la radioactividad utilizando el recuento por centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína o sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar a la glicoproteína utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

(c) Existen diversos marcadores de enzima-sustrato disponibles y la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima cataliza generalmente una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia están descritas anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y, a continuación, puede emitir una luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un receptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrotalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidada de rábano picante (HRPO), alcalina fosfatasa, β galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzymology* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

Entre los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidada oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilén diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(b) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(c) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbilferil- β -D-galactosidasa.

Existen numerosas combinaciones de enzima-sustrato disponibles para los expertos en la materia. Para una revisión general de éstas, véase la Patente de Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, el marcador se conjuga indirectamente con la glicoproteína. El experto en la materia tendrá presente las diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, la glicoproteína se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. A biotina se une selectivamente a avidina y, de este modo, el marcador se puede conjugar con la glicoproteína de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con la glicoproteína, la glicoproteína se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con la glicoproteína.

En otra realización de la presente invención, no es necesario marcar la glicoproteína y la presencia de la misma se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une a la glicoproteína.

La glicoproteína de la presente invención se puede utilizar en cualquiera de los métodos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitivos, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158 (CRC, Press, Inc. 1987).

La glicoproteína también se puede utilizar para los ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, la glicoproteína se marca con radionucleidos (tales como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{19}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P , o ^{35}S), de manera que el antígeno o células que lo expresan se localizan utilizando inmunocentelleografía.

I. Usos *in vivo* de la glicoproteína

Se contempla que la glicoproteína de la presente invención pueda usarse para tratar un mamífero, por ejemplo un paciente que padece, o tiene predisposición, de una enfermedad o trastorno que podría beneficiarse de la administración de la glicoproteína. Las afecciones que pueden tratarse con la glicoproteína son diversas e incluyen cáncer (por ejemplo cuando la glicoproteína se une a un antígeno asociado a tumor, un antígeno de superficie de célula B, tal como CD20, un receptor ErbB, tal como el receptor HER2, un factor angiogénico, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); afecciones alérgicas, tal como el asma (con un anticuerpo anti-IgE); y trastornos mediados por LFA-1 (por ejemplo, cuando la glicoproteína es un anticuerpo anti-LEA-1 o anti-ICAM-1), etc. En caso de que el anticuerpo que se une a un marcador de superficie de células B, tal como CD20, las afecciones preferentes son tumores por células B (por ejemplo, linfoma que no es de Hodgkin), una enfermedad autoinmune, o para bloquear una respuesta inmune ante un antígeno extraño (ver WO01/03734).

Cuando el anticuerpo se une a un receptor ErbB, el trastorno es preferiblemente cáncer que expresa ErbB, por ejemplo un tumor benigno o maligno caracterizado por la sobreexpresión del receptor de ErbB. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, se puede preparar una glicoproteína con una región Fc variante que ha incrementado la actividad de ADCC. Tales moléculas tendrán aplicación en el tratamiento de diferentes trastornos.

Por ejemplo, puede emplearse la glicoproteína con actividad de ADCC aumentada en el tratamiento de enfermedades o trastornos cuando se desee la destrucción o la eliminación de tejido o microorganismos externos. Por ejemplo, puede utilizarse la glicoproteína para tratar el cáncer; enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios; infecciones (por ejemplo infecciones bacterianas, virales, fúngicas o de levaduras); y otras afecciones (como el bocio) donde se desea la extirpación de tejido, etc.

La glicoproteína se administra mediante cualquier medio apropiado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea, para un tratamiento inmunosupresor local, intraleSIONAL. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o administración subcutánea. Además, la glicoproteína se administra de manera adecuada mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis descendentes de la glicoproteína. Preferiblemente se administra la dosis mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosis apropiada de glicoproteína dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si se administra la glicoproteína con propósito preventivo o terapéutico, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la glicoproteína, y el criterio del médico que le atiende. La glicoproteína se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de glicoproteína es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o mas administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual puede variar desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante diversos días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otras pautas de dosis. Se monitoriza fácilmente el progreso de esta terapia mediante técnicas y ensayos convencionales. Los Ejemplos de la presente invención demuestran que pueden administrarse dosis más bajas de la glicoproteína (por ejemplo, anticuerpo sin fucosa), en comparación con la glicoproteína que contiene fucosa.

La composición de la glicoproteína debe formularse, dosificarse, y administrarse de un modo constante con buena práctica médica. Entre los factores para la consideración en este contexto se incluyen el trastorno particular que está siendo tratado, el mamífero concreto que está siendo tratado, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. Se determinará la "cantidad terapéuticamente efectiva" de la glicoproteína que va a administrarse mediante dichas consideraciones, y es la cantidad mínima de necesaria para prevenir, aliviar, o tratar una enfermedad o trastorno. No es necesario, pero la glicoproteína opcionalmente se formula con uno o más agentes actualmente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de glicoproteína presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración tal y como se utilizan anteriormente en la presente invención o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis empleadas hasta este momento.

Generalmente se colocan las composiciones de anticuerpo terapéutico en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que presenta un tapón penetrable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Un paciente de cáncer para ser tratado con un anticuerpo como antagonista tal como se describe en la presente invención puede también recibir terapia de radiación. Alternativamente, o adicionalmente, se puede administrar un agente quimioterapéutico al paciente. Se pueden utilizar la preparación y programación de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos según las instrucciones de los fabricantes o tal y como se determina empíricamente por el médico experto. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, William & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración del antagonista o puede administrarse simultáneamente con éste. Para afecciones de cáncer, puede ser deseable administrar también anticuerpos adicionales contra los antígenos asociados al tumor o contra factores angiogénicos, tales como anticuerpos que se unen a HER2 o al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden co-administrar una o más citoquinas al paciente.

Pueden proporcionarse composiciones de glicoproteínas en un artículo de fabricación y un kit que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer, por ejemplo. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El recipiente contiene una composición que comprende las preparaciones de glicoproteína descritas en la presente invención. El agente activo en la composición es la glicoproteína concreta. La etiqueta del recipiente indica que la composición se utiliza para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno en particular, y también puede indicar instrucciones para la administración *in vivo*, tales como las descritas anteriormente.

El kit comprende el recipiente descrito anteriormente y un segundo recipiente que comprende un tampón. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables des de un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones de uso.

La presente invención se comprenderá más completamente en referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, ser interpretados como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Con el fin de evaluar el papel de oligosacárido fucosilado en la función de IgG, se utilizó la línea celular Lec13 (Ripka *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)) para expresar la IgG1 humana. Esta línea celular CHO es deficiente en su capacidad de añadir fucosa, pero proporcionaba IgG con oligosacáridos que era sin embargo similar a la hallada en líneas celulares de CHO normales y del suero humano. Los productos IgG resultantes se utilizaron para evaluar el efecto de carbohidrato fucosilado sobre las funciones efectoras del anticuerpo, incluyendo la unión a Fc γ R humana, C1q humano, FcRn humano y ADCC que utilizan células efectoras humanas.

Ejemplo 1

Unión a FcR humano

5 *Construcciones de ADNc para líneas celulares estables:* Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-HER2 humanizado Hu4D5 (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)), el anticuerpo anti-IgE humanizado, madurado por afinidad E27 (Patente de Estados Unidos No. 6.172.213), y el anticuerpo anti-CD20 quimérico C2B8 (Patente de Estados Unidos No. 5.736.137) se subclonaron en un vector de expresión de células de mamífero descrito anteriormente (Lucas *et al.* Nucl. Acid Res. 24, 1774-1779 (1996)). Se utiliza puromicina como marcador selectivo en
10 células DHFR(+), tales como las células Lec13, y se mantuvo el sitio de DHFR para la amplificación con metotrexato de 1 línea celular estable.

Transfección y Cultivo de células Lec13 y CHO de tipo natural: La línea de células CHO Pro-Lec13.6a (Lec13), se obtuvo de la Profesora Pamela Stanley de Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University. Las líneas parentales son Pro- (prolina auxótrofa) y Gat- (glicina, adenosina, timidina auxótrofa). La línea celular CHO-DP12 utilizada para anticuerpos de tipo natural deriva de la línea celular CHO-K1 (ATCC #CCL-61), que es deficiente en dihidrofolato reductasa, y presenta una menor necesidad por la insulina. Las líneas celulares se transfectaron con ADNc utilizando el método Superfect (Qiagen, Valencia, CA). La selección de las células Lec13 que expresan los anticuerpos transfectados se realizó utilizando diclorhidrato de puromicina (Calbiochem, San Diego, CA) a 10 µg/ml en medio de cultivo que
15 contiene: Medio MEM Alfa con L-glutamina, ribonucleótidos y desoxirribonucleósidos (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado con FBS inactivado al 10% (GIBCO), 10 mM HEPES, y 1X penicilina/estreptomicina (GIBCO). Las células CHO se seleccionaron de modo similar en medio de cultivo que contenía F12 de Ham sin GHT: DMEM bajo de glucosa sin Glicina con NaHCO₃ suplementado con FBs al 5% (GIBCO), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 1X GHT (glicina, hipoxantina, timidina), y 1X penicilina/estreptomicina. Las colonias formadas en dos a tres semanas
25 se agruparon para la expansión y la expresión de la proteína. Los grupos de células se sembraron inicialmente a 3 x 10⁶ células/10 cm de placa para la expresión de proteína en pequeños lotes. Las células se convirtieron en un medio libre de suero una vez habían crecido hasta una confluencia de 90-95% y después de 3-5 días se recogieron los sobrenadantes celulares y se analizaron en una ELISA para Fc de IgG e IgG intacta para estimar los niveles de expresión de proteína. Las células Lec13 y CHO se sembraron a aproximadamente 8 x 10⁶ células/15 cm de placa un día antes de
30 convertirse en el medio de producción PS24, suplementado con 10 mg/L de insulina humana recombinante y 1 mg/L de elementos traza.

Expresión de proteínas: Las células Lec13 y CHO permanecieron en un medio de producción libre de suero durante 3-5 días. Se recogieron los sobrenadantes y se purificaron mediante centrifugación en tubos cónicos de 150 ml para extraer las células y el residuo celular. Se añadieron inhibidores de proteasa PMSF y aprotinina (Sigma, St. Louis, MO) y se concentraron los sobrenadantes 5 veces sobre las células agitadas utilizando filtros MWCO30 (Amicon, Beverly, MA) antes de la purificación inmediata utilizando cromatografía de proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)). Todas las proteínas se intercambiaron con tampón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizando concentradores Centriprep-30 (Amicon) y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-
40 SDS. Las concentraciones de las proteínas se determinaron utilizando A280 y se verificaron utilizando el análisis de la composición de aminoácidos. De promedio, las células Lec13 generaron 10 µg de mAb por placa de 15 cm; la expresión en las células CHO de control para todos los anticuerpos fue 4-5 veces más elevada que en las células Lec13. Los anticuerpos generados a partir de CHO-DP12 desarrolladas en placas se indicarán como CHO-P.

45 Las células CHO-DP12 también se desarrollaron en matraces de agitación. Las células se sembraron a 6 x 10⁵ células/ml y se desarrollaron a 37°C durante dos días. En el tercer día, la temperatura se varió a 33°C y las células se dejaron desarrollar hasta que la viabilidad descendió hasta el 70% debido a la caída del pH hasta ~6,5. Los anticuerpos derivados de células CHO-DP12 desarrollados en matraces de agitación se indicarán como CHO-S.

50 *Análisis por espectro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matrices (MALDI-TOF) de oligosacáridos unidos a asparagina:* Se liberaron oligosacáridos unidos a N de glicoproteínas recombinantes utilizando el procedimiento de Papac *et al.*, Glycobiology 8, 445-454 (1998). En resumen, los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta de PVDF (Millipore, Bedford, MA) se acondicionaron con 100 µl de metanol que se extrajeron a través de las membranas de PVDF mediante la aplicación de vacío al colector de
55 vacío Millipore Multiscreen Las membranas de PVDF acondicionadas se lavaron con 3 X 250 µl de agua. Entre todas las etapas de lavado, los pocillos se drenaron completamente mediante la aplicación de vacío suave al colector. Las membranas se lavaron con reducción y tampón de carboximetilación (RCM) que consistía en clorhidrato de guanidina 6 M, Tris 360 mM, EDTA 2 mM, pH 8,6. Las muestras de glicoproteína (50 µg) se aplicaron a pocillos individuales, se extrajeron de nuevo a través de las membranas de PVDF mediante vacío suave y los pocillos se lavaron con 2 x
60 50 µl de tampón RCM. Las muestras inmovilizadas se redujeron mediante la adición de 50 µl de una solución de ditiotreitól (DTT) 0,1 M a cada pocillo y la incubación de la placa de microtitulación a 37°C durante 1 hora. Se extrajo el DTT mediante vacío y los pocillos se lavaron con 4 x 250 µl de agua. Los residuos de cisteína se carboximetilaron mediante la adición de 50 µl de una solución de ácido yodoacético (IAA) 0,1 M que se preparó de forma reciente en NaOH 1 M y se diluyó hasta 0,1 M con tampón RCM. La carboximetilación se realizó mediante la incubación durante
65 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se aplicó vacío a la placa para extraer la solución de IAA y los pocillos se lavaron con 4 x 250 µl de agua purificada. Las membranas de PVDF se bloquearon mediante la adición de 100 µl de una solución de PVP360 (polivinilpirrolidina PM 360.000) (Sigma) al 1% y la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución PVP-360 se extrajo mediante vacío suave y los pocillos se lavaron con 4 x 250

ES 2 326 964 T3

μl de agua. La solución de digesto de PNGasa F (New England Biolabs, Beverly, MA), 25 μl de una solución de 25 Unidades/ml en 10 mM de acetato de Tris, pH 8,4, se añadió a cada pocillo y se procesó el digesto durante 3 horas a 37°C. Después de la digestión, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 500 μl y se añadieron 2,5 μL de una solución de ácido acético 1,5 M a cada muestra. Las muestras acidificadas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente para convertir los oligosacáridos de las glicosaminas en la forma hidroxilo. Antes del análisis de espectro de masas MALDI-TOF, los oligosacáridos liberados se desalaron utilizando un lecho de 0,7 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8 en la forma de hidrógeno) (Bio-Rad, Hercules, CA) empaquetada como una emulsión en tubos de reacción compactos. (US Biochemical, Cleveland, OH).

Para el análisis del espectro de masas MALDI-TOF de las muestras en modo positivo, los oligosacáridos desalados (alícuotas de 0,5 μl) se aplicaron al objetivo neto con 0,5 μl de la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (sDHB) que se preparó mediante la disolución de 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con 0,1 mg de ácido 5-metoxisilícico en 1 ml de etanol/cloruro sódico 10 mM 1:1 (v/v). La mezcla de muestra/matriz se secó al vacío. Para el análisis en el modo negativo, los oligosacáridos unidos a N desalados (alícuotas de 0,5 μl) se aplicaron al objetivo neto junto con 0,5 μl de matriz de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THAP) preparada en acetonitrilo/tampón de citrato de amonio 13,3 mM 1:3 (v/v). La mezcla muestra/matriz se secó al vacío y a continuación se dejó que absorbiera la humedad atmosférica antes del análisis. Los oligosacáridos liberados se analizaron por MALDI-TOF en un espectrómetro de masas PerSeptive BioSystems Voyager-DE. El espectrómetros de masas se utilizó a 20 kV en modo positivo o negativo con la configuración lineal y utilizando una extracción con retraso. Los datos se obtuvieron utilizando una fuente de energía láser de 1300 y en el modo de suma de datos (240 rastreos) para mejorar la señal sobre el ruido. El instrumento se calibró con una mezcla de oligosacáridos estándar y los datos se dispusieron como una función continua utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay de 19 puntos antes de asignar las masas. La integración de los datos del espectro de masas se consiguió utilizando el paquete de software de análisis de datos Caesar 7.0 (SciBridge Software). Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 326 964 T3

TABLA 2

Unión de los anticuerpos a FcγR humano

		Media (S.D.)	N	%-Fuc ^c	%Gal10	%Gal11	%Gal12
5	FcγRI ^{a,b}						
	CHO-S	1,00	5	3	53	42	6
10	CHO-P	0,97 (0,07)	5	2	73	25	3
	Lec13 (A)	1,04	4	92	50	43	7
15	Lec13 (B)	1,04	5	91	55	40	5
	FcγRIIA (R131) ^c						
20	CHO-S	1,00	3	3	53	42	6
	CHO-P	0,87 (0,14)	2	2	73	25	3
	Lec13 (A)	1,70 (0,04)	3	92	50	43	7
25	Lec13 (B)	1,49 (0,16)	3	91	55	40	5
	Lec13 (C)	1,77 (0,38)	3	93	51	43	7
	Lec13 (D)	1,71 (0,40)	3	88	51	43	7
30	Lec13-	1,62 (0,32)	12	91 (2)	52 (2)	42 (2)	7 (1)
	Promedio						
35	FcγRIIA (H131) ^d						
	CHO-S	1,00	3	3	53	42	6
40	CHO-P	0,87 (0,07)	2	2	73	25	3
	Lec13 (A)	0,93 (0,08)	3	92	50	43	7
	Lec13 (B)	0,75 (0,07)	3	91	55	40	5
45	Lec13 (C)	0,94 (0,15)	3	93	51	43	7
	Lec13 (D)	0,91 (0,07)	3	88	51	43	7
	Lec13-	0,88 (0,12)	12	91 (2)	52 (2)	42 (2)	7 (1)
50	Promedio						
	FcγRIIB ^c						
55	CHO-S	1,00	3	3	53	42	6

ES 2 326 964 T3

	CHO-P	0,81(0,11)	2	2	73	25	3
5	Lec13(A)	2,27(0,35)	3	92	50	43	7
	Lec13(B)	1,51(0,22)	3	91	55	40	5
	Lec13(C)	2,07(0,33)	2	93	51	43	7
10	Lec13(D)	1,60(0,45)	3	88	51	43	7
	Lec13-	1,81(0,49)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
	Promedio						
15	FcγRIIIA(F158) ^e						
	CHO-S	1,00	3	3	53	42	6
20	CHO-P	0,94(0,01)	2	2	73	25	3
	Lec13(A)	27,0(2,1)	3	92	50	43	7
	Lec13(B)	22,8(2,3)	3	91	55	40	5
25	Lec13(C)	25,1(2,4)	3	93	51	43	7
	Lec13(D)	22,3(1,0)	3	88	51	43	7
	Lec13-	24,3(2,6)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
30	Promedio						
	HEK293-	20,8(0,9)	2				
35	AAA						
	Lec13-	32,8	1	95	75	22	2
	AAA(A)						
40	Lec13-	32,9(2,9)	3	92	75	22	3
	AAA(B)						
	Lec13-	34,8(3,0)	2				
45	AAA(C)						
	Lec13-	33,5(2,1)	6				
	AAA-						
50	Promedio						
55	FcγRIIIA(F158) ^f						
	HEK293	1,00	2				
	DP12	0,35(0,01)	2				
60	Lec13	7,63(0,20)	2				
65							

ES 2 326 964 T3

FcγRIIIA(F1.58)^g

HEK293	1,00	3
CHO-P	0,65(0,24)	3
Lec13	1,92(0,39)	3

HEK293-	1,87(0,24)	3
AAA		

Células CHO transfectadas con FcγRIIIA(F158)^h

CHO-S	1,00		4
Lec13-D	15,7	2,4	4
Lec13-E	17,0	3,1	3
Lec13-F	15,8	3,2	3
Lec13-	16,1	2,5	10

Promedio

HEK293-	10,7	1,4	3
---------	------	-----	---

AAA

Lec13-	26,8	6,6	3
--------	------	-----	---

AAA-B

Lec13-	25,9	5,9	3
--------	------	-----	---

AAA-C

Lec13-	26,4	5,6	6
--------	------	-----	---

AAA-

Promedio

FcγRIIIA(V158)^e

CHO	1,00	3	3	53	42	6
DP12	0,61(0,01)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	14,9(2,9)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	12,5(1,3)	3	91	55	40	5
Lec13(C)	12,6(3,3)	3	93	51	43	7
Lec13(D)	14,5(1,9)	3	88	51	43	7
Lec13-	13,6(2,4)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)

Avg

ES 2 326 964 T3

	HEK293-	9,3	1				
	AAA						
5	Lec13-	25,4	1	95	75	22	2
	AAA- (A)						
10	Lec13-	23,8 (1,1)	3	92	75	22	3
	AAA (B)						
	Lec13-	22,5 (0,2)	2				
	AAA (C)						
15	Lec13-	23,1 (1,4)	6				
	AAA-						
20	Promedio						
	FcγRIIIA (V158) ^f						
25	HEK293	1,00	2				
	CHO-P	0,32 (0,01)	2				
30	Lec13	6,44 (0,19)	2				
	FcγRIIIA (V158) ^g						
35	HEK293	1.00	3				
	CHO-P	1.00 (0.13)	3				
	Lec13	1.18 (0.10)	3				
40	HEK293-	1,15 (0,05)	3				
	AAA						

a Todos los valores son la proporción de A(variante)/A(estándar) medida a A_{490 nm}. CHO-S representa IgG expresada por células CHO en matraces de agitación, CHO-P representa IgG expresada por células CHO en placas de 15 cm, Lec13 representa IgG expresada en células Lec13 en placas, HEK293 representa IgG expresada por células 293 de riñón embrionario humano, AAA representa la variante de IgG1 Ser298ala/Glu333Ala/Lys334Ala, Lec13-S representa IgG expresada en células Lec13 en un matraz de agitación (en lugar de placas). Las letras en paréntesis indican grupos de IgG expresadas independientemente.

b Dímeros de Hu4D5 a [mAb] = 0,12 μg/ml

c %-Fuc es el porcentaje de oligosacárido total sin fucosa, %Gal0, %Gal1, %Gal2 son el porcentaje de oligosacárido total con ningún (agalactosilo), uno (monogalactosilo), o dos (digalactosilo) residuos de galactosa unidos covalentemente a los residuos de manosa terminales. Los valores en paréntesis son desviaciones de la media para los cuatro grupos de Lec3-Hu4D5 expresados independientemente.

d Dímeros de Hu4D5 a [mAb] = 3,33 μg/ml

e Dímeros de Hu4D5 a [mAb] = 1,1 μg/ml

f Dímeros de Hu4D5 a [mAb] = 0,12 μg/ml

g Dímeros de E27 a [mAb] = 0,12 μg/ml

h Hexámeros de E27 a [mAb] = 0,12 μg/ml

Anteriormente se han descrito ensayos para medir la unión de IgG1 a FcγR y FcRn (formato ELISA y basado en células) (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001) y WO00/42072 (Presta).

La IgG1 de Lec13-Hu4D5 monomérico se unió al equivalente de FcγRI humano a la unión de Hu4D5-CHO-S y CHO-P (Fig. 4; Tabla 2). Aunque la presencia de carbohidrato es necesaria para la unión a FcγRI (Walker *et al.* Biochem. J. 259:347-353 (1989)), la unión equivalente de IgG1 a pesar de las diferencias en el contenido de fucosa (Lec13 versus CHO) o galactosa (CHO-P versus CHO-S) muestra que el FcγRI humano no es sensible a la presencia de estos grupos en el carbohidrato. Anteriormente se ha estudiado el efecto de la galactosilación en la unión de IgG a FcγRI humano (Wright *et al.* J. Immunol. 160: 3393-3402 (1998); Kumpel *et al.* Human Antibod. Hybridomas 5: 143-151 (1994); y Tsuchiya *et al.* J. Rheumatol. 16: 285-290 (1989)) y una revisión de los datos sugiere que si la galactosilación afecta a la unión a FcγRI, esta es sutil y puede ser dependiente de isotipo (Wright *et al.* J. Immunol. 160: 3393-3402 (1998)).

En contraste con la unión monomérica de IgG1 al FcγRI humano, los ensayos de unión para los FcγR humanos de baja afinidad (FcγRII, FcγRIII) requirió la formación de dímeros (Hu4D5, HuE27) o hexámeros (HuE27) para conseguir la detección de la unión. El FcγRIIA humano tiene dos alotipos naturales conocidos que están determinados por el aminoácido en la posición 131 (Clark *et al.* J. Immunol. 143: 1731-1734 (1989)). El FcγRIIA humano tiene alotipos naturales en la posición 48 (Leu, His o Arg) y en la posición 158 (Val o Phe); el alotipo de FcγRIIA (Val158) interacciona con IgG humana mejor que el alotipo de FcγRIIA (Phe158) (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Koene *et al.* Blood 90:1109-1114 (1997); y Wu *et al.* J. Clin Invest. 100: 1059-1070 (1997)).

La unión de dímeros Lec13-Hu4D5 con FcγRIIB humano y la forma polimórfica de R131 humana de FcγRIIA mostró una mejora en la unión de 1,8 veces y 1,6 veces, respectivamente, en comparación con CHO-Hu4D5 (Fig. 5, 6; Tabla 2). En cambio, la falta de fucosa no afectó a la unión a la forma polimórfica H131 de FcγRIIA humano (Fig. 7; Tabla 2). El incremento similar en la unión de IgG1 sin fucosa con respecto a FcγRIIA humano (R131) y FcγRIIB, cada uno con arginina en la posición 131, contra ningún efecto en FcγRIIA (H131) sugiere que la fucosa puede bien interaccionar directamente con el residuo de FcγR en la posición 131 o bien alterar la conformación de IgG1 de manera que presenta una influencia negativa y sutil sobre la unión cuando la arginina está presente en la posición 131.

Ambas formas polimórficas de FcγRIIA mostraron una unión significativamente mejorada con IgG1 la cual carecía de fucosa. La unión de Lec13-Hu4D5 dímérico a FcγRIIA (V158) mostró un incremento de 14 veces sobre CHO-Hu4D5 (Fig. 8; Tabla 2) y la unión a FcγRIIA (F158) mostró por lo menos un incremento de 100 veces (Fig. 9). Los dímeros Lec13-HuE27 también mostraron una unión incrementada a ambas formas polimórficas de FcγRIIA (Fig. 10, 11; Tabla 2).

En un estudio previo del efecto de las variantes de las secuencias de proteínas de IgG1 humana en la unión a FcγR humano, se utilizaron complejos hexaméricos que consistían en tres E27 anti-IgE y tres IgE (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001)); por lo tanto, estos complejos son triméricos en E27 anti-IgE. En este estudio, el incremento en la unión de una variante S298A/E333A/K334A-IgG1 a FcγRIIA (F158) y FcγRIIA (V158) fue de 1,5 a 2 veces y 1,1 veces, respectivamente; aunque que el incremento puede parecer mínimo, el efecto en ADCC fue significativo (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001)). En el estudio actual, el complejo hexamérico de S298A/E333A/K334A-IgG1 mostró una unión mejorada a ambas formas polimórficas de FcγRIIA en la línea con los valores del estudio anterior (Fig. 12, 13; Tabla 2); asimismo el complejo hexamérico de Lec13-HuE27 (IgG1 nativa) mostró una unión incrementada de aproximadamente 2 veces a FcγRIIA (F158) (Tabla 2). Cuando se analizaron como dímeros, la variante S298A/E333A/K334A-IgG1 con fucosa mostró un incremento de 9 veces y 20 veces en la unión a FcγRIIA (V158) y FcγRIIA (F158), respectivamente; la misma variante sin fucosa mostró incluso un mayor incremento en la unión a las formas polimórficas de hasta 21 veces y 33 veces, respectivamente (Tabla 2). Por lo tanto, la ausencia de fucosa no sólo incrementa la unión de IgG1 nativa a FcγRIIA, sino que también puede aumentar la unión de variantes de Fc IgG1. De este modo, las alteraciones de proteína y carbohidrato son sinérgicas.

Para todas las formas de HuE27 (S298A/E333A/K334A-IgG1 nativa, derivada de Lec13), el incremento en la unión del complejo más grande (trimérico en HuE27) fue mucho más pequeño que el observado por el mismo mA b como complejo dímérico. Por ejemplo, la unión de Lec13-HuE27 como dímero mostró un incremento de aproximadamente 20 veces, pero sólo un incremento de 2 veces para el complejo más grande (Tabla 2). Esto sugiere que a medida que se incrementa el tamaño del complejo inmune, el efecto de avidez puede empezar a dominar sobre la unión.

Se confirmó la unión incrementada de IgG1 deficiente de fucosa a FcγRIIA con la cadena α de longitud completa de FcγRIIA (Phe 158) co-expresada con la cadena γ en células CHO (Fig. 28; Tabla 2). En cuanto a la proteína de fusión de cadena γ sola en formato ELISA, la deficiencia de fucosa fue sinérgica con la variante S298A/E333A/K334A-IgG1.

También se evaluó la unión de la IgG nativa y sin fucosa a FcγRII y FcγRIII de murino. La IgG1 humana, incluso como dímero, se une mal a estos receptores y no se observa ningún incremento en la unión con la IgG1 sin fucosa. Otro receptor de IgG, el receptor de Fc neonatal (FcRn), no está relacionado estructuralmente con el FcγR (Burmeister *et al.* Nature 372: 379-383 (1994); y Raghavan *et al.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 181-220 (1996)) y se ha propuesto que está implicado en diversos procesos biológicos incluyendo el índice de purificación de IgG (Ghetie *et al.* Annu. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)). La unión de IgG1 fucosilada y no fucosilada con FcRn fue equivalente (Fig. 14).

Esto no es sorprendente ya que la IgG1 aglicosilada se une a este receptor de forma similar a la IgG1 glicosilada (aglico Ab se une a FcRn).

La falta de fucosa en el carbohidrato unido por Asn297 dio lugar a una unión significativamente incrementada a FcγRIIIA humano (tanto la forma polimórfica F158 como la V158) en un ensayo de formato ELISA. Se confirmó adicionalmente la unión aumentada a FcγRIIIA mediante la capacidad de la IgG sin fucosa para estimular la citotoxicidad en ensayos ADCC utilizando PBMCs humanas purificadas. La citotoxicidad incrementada fue especialmente evidente a concentraciones inferiores de anticuerpo, sugiriendo que los anticuerpos terapéuticos que utilizan ADCC podrían posiblemente darse a dosis inferiores para efectuar una muerte celular equivalente a IgG fucosilada a dosis más elevadas.

Se observó un incremento menor en la unión de IgG sin fucosa para FcγRIIA (R131) y FcγRIIB humanos; no se observó diferencias para FcγRIIA (H131) humano. Los dos primeros receptores tienen arginina en la posición 131, implicando, sin que se limite a esta teoría, que en la IgG fucosilada el residuo de fucosa puede interaccionar directamente (y evidentemente, negativamente) con el residuo 131 de FcγRII o puede influir sutilmente en la conformación de IgG, la cual da lugar a una interacción negativa. Aunque el incremento en la unión de IgG sin fucosa a FcγRIIA (R131) y FcγRIIB en los ensayos de formato ELISA fue pequeño (~ 2 veces), los ensayos ADCC que utilizan monocitos también mostraron cierta citotoxicidad aumentada a concentraciones más bajas de anticuerpo. Los monocitos expresan FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y sólo una subpoblación de monocitos expresa FcγRIIIA. Dado que la unión a FcγRI humano fue equivalente tanto para fucosil IgG como para IgG sin fucosa, el incremento en ADCC probablemente no se debe a la interacción diferencial con FcγRII. Los monocitos donantes tanto de FcγRIIA (R131/R131) como de FcγRIIA (H131/H131) mostraron cierto incremento en ADCC (Figs. 21, 22) sugiriendo, sin limitarse a ninguna teoría, que (1) FcγRIIA puede no expresarse a un nivel suficientemente alto en los monocitos para mostrar una diferencia entre las dos formas polimórficas, (2) FcγRIIB puede ser el FcγR predominante de unión (de ese modo afectando por igual a tanto monocitos R131/R131 como H131/H131), o (3) la subpoblación de monocitos que expresan FcγRIIA es responsable del ADCC incrementado.

La comparación entre el carbohidrato encontrado en la IgG nativa y la IgG producida en Lec143 y en CHO no mostró diferencias en el grado de galactosilación y por lo tanto pueden atribuirse los resultados exclusivamente a la presencia/ausencia de fucosa. No obstante, para la variante de IgG1 S298A/E333A/K334A, la IgG producida por Lec13, HEK293 y DP12 mostró variación en la galactosilación. No obstante, la combinación de variación de la secuencia de la proteína y la falta de fucosa pareció ser aditiva.

Un estudio previo de variantes de la secuencia de proteínas de IgG humana descubrió que sustituciones de alanina (y otras) en algunas posiciones de Fc podrían reducir o incrementar las uniones a FcγR, así como mostrar una mejor ADCC (Shields *et al.* J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604 (2001). De modo destacado, algunas de estas no estaban cerca del punto de contacto de la interacción encontrada en una estructura cristalina del complejo Fc de IgG humana-FcγRIIIA humano (Sondermann *et al.* Nature 406:267-273 (2000)). Por ejemplo, de las tres sustituciones de alanina S298A/E333A/K334A utilizadas en este estudio, sólo S298 se encuentra en el punto de contacto de Fc-FcγRIIIA en la estructura cristalina. Así mismo, en la estructura de cocristal ninguno de los residuos de fucosa en las dos cadenas pesadas de Fc interaccionan con el FcγRIIA. La inspección de las estructuras cristalinas de las Fc o IgG de humanos y roedores muestra que la fucosa puede adoptar una conformación variable y exhibe factores B elevados, sugiriendo un alto grado de movilidad.

Las células normales de CHO y HEK293 añaden fucosa al oligosacárido de IgG en un alto grado (97-98%). Las IgG de sueros también están altamente fucosiladas.

Ejemplo 2

Unión de C1q y FcRn

La unión de C1q a anticuerpos es la primera etapa en el mecanismo clásico de activación del complemento (Makrides, S. C. Pharmacol. Rev. 50: 59-87 (1998)). La naturaleza del carbohidrato en la IgG influye en la interacción con C1q (Wright *et al.*, J. Immunol. 160: 3393-3402 (1998); Boyd *et al.*, molec. Immunol. 32: 1311-1318 (1995), y Tsuchiya *et al.*, J. Rheumatol. 16: 285-290 (1989)). Hu4D5 se une a C1q humano de peor manera que lo hace RITUXAN®, una IgG1 quimérica ratón/humana anti-CD20 (figuras 15, 16) (Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)), y la falta de fucosa no afectaron a la capacidad de Hu4D5 de interaccionar con C1q humano (figuras 15, 16). Asimismo, la presencia o ausencia de fucosa no parecía afectar a la unión de IgG1 a FcRn.

Ejemplo 3

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

La afectación de la falta de fucosa en ADCC se evaluó utilizando la IgG1 Lec13-Hu4D5 en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR3 (Hudziak *et al.* mol. Cell Biol. 9: 1165-1172 (1989)). Las PBMCs de dos donantes FcγRIIIA(V158/F158) y dos donantes FcγRIIIA(F158/F158) se utilizaron como células efectoras en una

proporción efector:diana 30:1. Para todos los donantes la IgG1 sin fucosa mostraba una mejora importante en ADCC en comparación con IgG1 con fucosa (figuras 17-20). De manera destacada, para todos los donantes, la mejora en la citotoxicidad era más evidente a medida que se reducía la concentración de anticuerpo. Esto puede reflejar la mayor unión observada para los dímeros en comparación con la de los hexámeros, es decir, la variante sin fucosa puede requerir menos mABs en la superficie de la célula diana con el fin de realizar la unión/activación de una célula efectora.

Los monocitos humanos expresan FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y sólo una subpoblación expresa FcγREIIA. Dado que la falta de fucosa no afectaba a la unión a FcγRI, pero presentaba un pequeño efecto en la unión a FcγRIIA (R131) y FcγRIIB, se realizaron ensayos de ADCC utilizando monocitos humanos purificados como células efectoras en proporciones efector:diana de 20:1, 10:1 y 5:1. La purificación de monocitos es más difícil que la purificación de PBMCs y consecuentemente el ensayo de ADCC es más difícil. Como con la ADCC de PBMC, la ADCC de monocitos mostró una mejora citotoxicidad para la IgG1 que carecía de fucosa, aunque el efecto parece menos pronunciado y la capacidad de los monocitos para matar las células diana se reduce en comparación con PBMCs (figuras 21.22).

Ejemplo 4

Actividad ADCC de anticuerpos con variantes de Fc

Los siguientes experimentos compararon: (1) Hu4D5 que expresaba en células CHO (Hu4D5 CHO-S), (2) variante de Hu4D5 deficiente en fucosa expresada en células Lec13 (hu4D5Lec13), (3) variante de Hu4D5 con una sustitución triple de alaninas del dominio Fc expresado en células 293 HEK (Hu4D5 HEK293-AAA) y (4) variante de Hu4D5 con una sustitución triple de alaninas del dominio Fc deficiente en fucosa expresado en células Lec13 (Hu4D5 Lec13-AAA).

Métodos ADCC: Se purificaron células asesinas (NK) a partir de sangre periférica de dos donantes mediante selección negativa utilizando partículas magnéticas (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Los donantes se seleccionaron de manera que eran homocigóticos para el alelo que expresaba la forma F158 de FcγR3 (CD16)(F/F158) (Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001)) que expresa un fenotipo de unión por afinidad inferior para IgG. Las células de carcinoma de mama SKBR-3 que sobreexpresan HER-2 se opsonizaron con 1 ng/ml de cada anticuerpo durante 45 minutos a 25°C en el medio de ensayo (Hams F12: DMEM 50:50 que contenía suero bovino fetal al 1% inactivado por el calor y 10 mM de tampón Hepes) y, a continuación, se trataron con concentraciones variables de células NK en proporciones de efector con respecto a la diana (E:T) que variaba de 10:1 a 0,156 durante 5 horas a 37°C en un incubador humidificado de CO₂. La citotoxicidad se midió mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando un kit comercial (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Métodos de Tinción por inmunofluorescencia indirecta de células NK: Se incubaron células NK purificadas con 2 µg/ml de cada variante de Hu4D5 durante 30 minutos a 4°C en tampón de tinción (solución salina tamponada con fosfatos, albúmina de suero bovino al 0,1%, azida sódica al 0,01%). Las células se lavaron 3 veces y se incubaron con mAb de ratón anti-humano CD56 conjugado con ficoeritrina (Pharmingen, San Diego, CA) y F(ab')₂ de IgG de cabra anti-humano FITC-F(ab')₂ específico (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 30 minutos adicionales a 4°C. Las células se analizaron para una tinción por inmunofluorescencia de dos colores en un citómetro de flujo FACScan™ (B.D. Biosciences, San Jose, CA).

Conclusión: En ambos donantes (5365 y 7580), hubo un aumento de la actividad ADCC en las proporciones de E/T superiores a 2 (véase las figuras 26 y 27) para la forma Hu4D5-Lec13-AAA de Hu4D5 en relación a Hu4D5-Lec13, a partir de lo cual se sugiere un aumento sinérgico de la unión de FcγRIII/ADCC en la variante de Fc con triple alanina deficiente en fucosa. Este aumento de la unión se confirmó mediante tinción por inmunofluorescencia indirecta de células NK en el donante 5365 (véase las figuras 24 y 2) en células NK que expresan CD56/CD16.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5610297 A [0006]
- WO 0042072 A [0017] [0197] [0348]
- US 5648260 A [0020]
- US 5624821 A [0020]

ES 2 326 964 T3

- WO 9429351 A [0023]
- US 6194551 B1 [0025]
- 5 • WO 9951642 A [0025]
- US 5047335 A [0028]
- US 5510261 A [0028]
- 10 • US 5278299 A [0028]
- WO 9730087 A [0033]
- 15 • WO 9954342 A [0034]
- WO 9858964 A, Raju [0035]
- WO 9922764 A, Raju [0035]
- 20 • WO 0061739 A [0036]
- WO 9833924 A [0038]
- 25 • US 6172213 B [0051] [0342]
- US 4816567 A [0085] [0086] [0214] [0223] [0225] [0267]
- US 5545807 A [0088]
- 30 • US 5545806 A [0088]
- US 5569825 A [0088]
- 35 • US 5625126 A [0088]
- US 5633425 A [0088]
- US 5661016 A [0088]
- 40 • US 5750373 A [0088]
- US 5821337 A [0119] [0120]
- 45 • WO 0100245 A [0119]
- WO 9817797 A [0119]
- US 5183884 A [0121]
- 50 • US 5480968 A [0121]
- EP 599274 A [0122]
- 55 • WO 9919488 A [0122]
- US 5736137 A [0125] [0125] [0126] [0258] [0342]
- US 5595721 A [0125]
- 60 • US 5677180 A [0125]
- US 5677171 A [0129]
- 65 • WO 9845479 A [0135]
- US 4933294 A [0135]

ES 2 326 964 T3

- WO 9105264 A [0135]
- US 5401638 A [0135]
- 5 • US 4943533 A, Mendelsohn [0139]
- WO 9640210 A [0139] [0258]
- US 5212290 A [0139]
- 10 • US 5891996 A [0139]
- WO 9850433 A [0139]
- 15 • EP 659439 A2 [0139]
- US 6242195 B1 [0197]
- US 5091178 A [0208]
- 20 • WO 9308829 A [0230]
- WO 9404690 A [0232]
- 25 • WO 9627011 A [0232]
- US 4676980 A [0233] [0233]
- WO 9100360 A [0233]
- 30 • WO 9220373 A [0233]
- EP 03089 A [0233]
- 35 • WO 0100238 A [0235]
- WO 0044788 A [0235]
- US 5208020 A [0241] [0241] [0248]
- 40 • EP 0425235 B1 [0241]
- US 5712374 A [0242]
- 45 • US 5714586 A [0242]
- US 5739116 A [0242]
- US 5767285 A [0242]
- 50 • US 5770701 A [0242]
- US 5770710 A [0242] [0243]
- 55 • US 5773001 A [0242]
- US 5877296 A [0242] [0243]
- US 5053394 A [0243]
- 60 • WO 9321232 A [0244]
- WO 9411026 A [0248] [0288]
- 65 • WO 8101145 A [0251]
- WO 8807378 A [0251]

ES 2 326 964 T3

- US 4975278 A [0251]
- US 4485045 A [0256]
- 5 • US 4544545 A [0256]
- WO 9738731 A [0256]
- US 5013556 A [0256]
- 10 • US 5725856 A [0258]
- US 5721108 B1 [0258]
- 15 • WO 9523865 A [0258]
- WO 9630046 A [0258]
- WO 9845331 A [0258]
- 20 • WO 0140309 A [0258]
- WO 0075348 A [0258]
- 25 • US 5622700 A [0258] [0258]
- WO 9823761 A [0258]
- WO 9519181 A [0258]
- 30 • US 5714338 A [0258] [0258]
- US 5091313 A [0258]
- 35 • WO 9304173 A [0258]
- WO 9901556 A [0258]
- WO 9726912 A [0258]
- 40 • WO 9851793 A [0258]
- US 5672347 A [0258]
- 45 • EP 0420937 B1 [0258]
- WO 9806248 A [0258]
- US 4515893 A [0258]
- 50 • US 5693762 A [0258]
- WO 9013646 A [0271]
- 55 • US 4965199 A [0278]
- EP 73657 A [0284]
- US 4419446 A [0286]
- 60 • US 4601978 A [0286]
- DD 266710 [0289]
- 65 • EP 402226 A [0290]
- EP 183070 A [0290]

ES 2 326 964 T3

- EP 244234 A [0290]
- US 4767704 A [0297]
- 5 • US 4657866 A [0297]
- US 4927762 A [0297]
- US 4560655 A [0297]
- 10 • US 5122469 A [0297]
- WO 9003430 A [0297]
- 15 • WO 8700195 A [0297]
- US RE30985 E [0297]
- EP 307247 A [0299]
- 20 • US 6180401 B [0299]
- US 3773919 A [0317]
- 25 • US 6267958 B [0318]
- US 6171586 B1 [0318]
- US 4275149 A [0321] [0323]
- 30 • US 4737456 A [0321]
- US 4318980 A [0323]
- 35 • WO 0103734 A [0328]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 40 • **KABAT** *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 [0003] [0015] [0052] [0089] [0180]
- **DEISENHOFER**, *Biochemistry*, 1981, vol. 20, 2361-2370 [0005]
- **STABILA**, P. *Nature Biotech*, 1998, vol. 16, 1357 [0006]
- 45 • **GLENNIE** *et al. Immunol. Today*, 2000, vol. 21, 403-410 [0007]
- **KING** *et al. Curr. Opin. Drug Discovery Develop*, 1999, vol. 2, 110-117 [0007]
- **VASWANI** *et al. Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1998, vol. 81, 105-119 [0007]
- 50 • **ABRAHAM** *et al. Sec. Intern. Autumnal Them. Meeting on Sepsis*, 1995 [0007]
- **CLYNES** *et al. Nature Med.*, 2000, vol. 6, 443-446 [0007]
- 55 • **CLYNES** *et al. PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0007] [0198]
- **ANDERSON** *et al. Biochem. Soc. Trans.*, 1997, vol. 25, 705-708 [0007]
- **WARD; GHETIE**, *Therapeutic Immunology*, 1995, vol. 2, 77-94 [0008] [0018] [0024]
- 60 • **DAËRON**, *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0010] [0012]
- **WARD; GHETIE**, *Therapeutic Immunol.*, 1995, vol. 2, 77-94 [0010]
- 65 • **RAVETCH; KINET**, *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-492 [0010] [0011]
- **RAVETCH** *et al. Ann. Rev. Immunol.*, 2001, vol. 19, 275-290 [0012] [0012]

ES 2 326 964 T3

- **LEHRNBECHER** *et al. Blood*, 1999, vol. 94 (12), 4220-4232 [0013]
- **HATTA** *et al. Genes and Immunity*, 1999, vol. 1, 53-60 [0013]
- 5 • **YAP** *et al. Lupus*, 1999, vol. 8, 305-310 [0013]
- **LORENZ** *et al. European J. Immunogenetics*, 1995, vol. 22, 397-401 [0013]
- **WU** *et al. J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100 (5), 1059-1070 [0013]
- 10 • **SHIELDS** *et al. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604 [0013] [0074] [0348]
- **KOENE** *et al. Blood*, 1997, vol. 90, 1109-1114 [0013] [0074] [0350]
- 15 • **WU** *et al. J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, 1059-1070 [0013]
- **GHEETIE** *et al. Annu. Rev. Immunol.*, 2000, vol. 18, 739-766 [0014] [0356]
- **WOOF** *et al. Molec. Immunol.*, 1986, vol. 23, 319-330 [0015] [0016]
- 20 • **DUNCAN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 563 [0015]
- **CANFIELD; MORRISON.** *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1483-1491 [0015]
- 25 • **CHAPPEL** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991, vol. 88, 9036-9040 [0015]
- **SARMAY** *et al. Molec. Immunol.*, 1984, vol. 21, 43-51 [0016]
- **GERGELY** *et al. Biochem. Soc. Trans.*, 1984, vol. 12, 739-743 [0016]
- 30 • **LUND** *et al. Molec. Immunol.*, 1992, vol. 29, 53-59 [0016]
- **ARMOUR** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, 2613-2624 [0016]
- 35 • **SHIELDS** *et al. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 9 (2), 6591-6604 [0017]
- **BURTON; WOOF.** *Advances in Immunol.*, 1992, vol. 51, 1-84 [0018]
- **BURTON** *et al. Nature*, 1980, vol. 288, 338-344 [0019]
- 40 • *Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22 (3), 161-206 [0019]
- **DUNCAN; WINTER.** *Nature*, 1988, vol. 332, 738-40 [0020]
- 45 • **TAO** *et al. J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, 661-667 [0021]
- **BREKKE** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 2542-47 [0021]
- **XU** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 152A [0023]
- 50 • **IDUSOGIE** *et al. J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 4178-4184 [0025] [0362]
- **SEGAL** *et al. J. Immunol. Meth.*, 2001, vol. 248, 1-6 [0026]
- 55 • **PENICHET** *et al. J. Immunol. Meth.*, 2001, vol. 248, 91-101 [0026]
- **LIFELY** *et al. Glycobiology*, 1995, vol. 5 (8), 813-822 [0028]
- **JEFFERIS** *et al. Immunol. Rev.*, 1998, vol. 163, 59-76 [0029]
- 60 • **WRIGHT** *et al. Trends Biotech*, 1997, vol. 15, 26-32 [0029]
- **LEATHERBARROW** *et al. Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22, 407-415 [0030]
- 65 • **DUNCAN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 738-740 [0030]
- **WALKER** *et al. Biochem. J.*, 1989, vol. 259, 347-353 [0030]

ES 2 326 964 T3

- **DORAI** *et al. Hybridoma*, 1990, vol. 10, 211-217 [0030] [0030]
- **HORAN HAND** *et al. Cancer Immunol. Immunother.*, 1992, vol. 35, 165-174 [0030] [0030]
- 5 • **HOBBS** *et al. Molec. Immunol.*, 1992, vol. 29, 949-956 [0030] [0030]
- **KIM** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 542-548 [0030] [0030]
- **WAWRZYNCZAK** *et al. Biochem. Soc. Trans.*, 1989, vol. 17, 1061-1062 [0030]
- 10 • **TAO** *et al. J. Immunol.*, 1989, vol. 143, 2595-2601 [0030]
- **WRIGHT** *et al. J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3393-3402 [0030] [0349] [0349] [0362]
- 15 • **PAREKH** *et al. Nature*, 1985, vol. 316, 452-457 [0030] [0030]
- **RAJU** *et al. Glycobiology*, 2000, vol. 10 (5), 477-486 [0030]
- **BOYD** *et al. Molec. Immunol.*, 1995, vol. 32 (17/18), 1311-1318 [0031]
- 20 • **KUMPEL** *et al. Hum. Antibod. Hybridomas*, 1994, vol. 5 (3-4), 143-151 [0031]
- **ROTHMAN** *et al. Molecular Immunol.*, 1989, vol. 26 (12), 1113-1123 [0032]
- 25 • **KAUSHAL** *et al. Meth. Enzymol.*, 1994, vol. 230, 316-329 [0032] [0032]
- **HASHIM** *et al. Immunology*, 1988, vol. 63, 383-388 [0032]
- **HASHIM** *et al. Molec. Immunol.*, 1987, vol. 24, 1087-1096 [0032]
- 30 • **UMANA** *et al. Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 176-180 [0034]
- **ROUTIER** *et al. Glycoconjugate J.*, 1997, vol. 14, 201-207 [0037]
- 35 • **STANKOVA** *et al. J. Immunol.*, vol. 135 (6), 3719-3728 [0038]
- **CAMERON** *et al. Immunol. Lett.*, 1985, vol. 11, 39-44 [0038]
- **MIMURA** *et al. Molecular Immunology*, August 2000, vol. 37, 697-706 [0040]
- 40 • **KOJIMA** *et al. J. Biol. Chem.*, August 1996, vol. 271, 19457-19463 [0041]
- **OHYAMA** *et al. J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 14582-14587 [0042]
- 45 • **LEHRNBECHER** *et al. Blood*, 1999, vol. 94, 4220 [0043]
- **HUBBARD** *et al. Ann. Rev. Biochem*, 1981, vol. 50, 555-583 [0053]
- **KABAT** *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 [0055]
- 50 • **STANLEY** *et al. J. Biol. Chem*, 1984, vol. 261, 13370-13378 [0060]
- **UMANA** *et al. Nature Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0060]
- 55 • **FUHRMANN** *et al. Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 825, 95-110 [0063]
- **KAUSHAL; ELBEIN**. *Methods in Enzym.*, 1994, vol. 230, 316-329 [0063]
- **ELBEIN**. *A. FASEB*, 1991, vol. 5, 3055-3063 [0063]
- 60 • **RIPKA; STANLEY**. *Somatic Cell & Molec. Gen.*, 1986, vol. 12 (1), 51-62 [0064]
- **RIPKA** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, vol. 249 (2), 533-545 [0064]
- 65 • **OHYAMA** *et al. J. Biol. Chem*, 1988, vol. 273 (23), 14582-14587 [0064]
- **UOZUMI** *et al. J. Biol. Chem*, 1996, vol. 271, 27810-27817 [0065]

ES 2 326 964 T3

- **YANAGIDANI** *et al. J. Biochem*, 1997, vol. 121, 626-632 [0065]
- **M. IN DAËRON**. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0074]
- 5 • **CLARK** *et al. J. Immunol*, 1989, vol. 143, 1731-1734 [0074]
- **WU** *et al. J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, 1059-1070 [0074]
- 10 • **RAVETCH; KINET**. *Annu. Rev. Immunol*, 1991, vol. 9, 457-92 [0074] [0075]
- **CAPEL** *et al. Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0074]
- **DE HAAS** *et al. J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0074]
- 15 • **GUYER** *et al. J. Immunol*, 1976, vol. 117, 587 [0074]
- **KIM** *et al. J. Immunol*, 1994, vol. 24, 249 [0074]
- 20 • **BURTON**. *Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22, 161-206 [0077]
- **KOHLER** *et al. Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0085] [0214]
- **CLACKSON** *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0085] [0222]
- 25 • **MARKS** *et al. J. Mol. Biol*, 1991, vol. 222, 581-597 [0085] [0222]
- **MORRISON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0086]
- 30 • **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0087] [0225]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0087]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0087]
- 35 • **VAUGHAN** *et al. Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0088]
- **SHEETS** *et al. PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0088]
- 40 • **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0088]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol*, 1991, vol. 222, 581 [0088]
- **MARKS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0088] [0222]
- 45 • **LONBERG** *et al. Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0088]
- **MORRISON**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0088]
- 50 • **FISHWILD** *et al. Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0088]
- **NEUBERGER**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 26 [0088]
- **LONBERG; HUSZAR**. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0088]
- 55 • **COLE** *et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0088]
- **BOERNER** *et al. J. Immunol*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0088]
- 60 • **CHOTHIA; LESK**. *J. Mol. Biol*, 1987, vol. 196, 901-917 [0089]
- **BERG** *et al. PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 4723-4727 [0093]
- **CHAMOW** *et al. J. Immunol*, 1994, vol. 153, 4268 [0093]
- 65 • **ELLMAN** *et al. Meth. Enzym.*, 1991, vol. 202, 301-336 [0101]
- **NOREN** *et al. Science*, 1989, vol. 244, 182 [0101]

- **RAGUPATHI G.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1996, vol. 43, 152 [0114]
- **GINALDI et al.** *Leukemia Research*, 1998, vol. 22, 185 [0114]
- 5 • **KIRKIN et al.** *APMIS*, 1998, vol. 106, 665 [0114]
- **CARPENTER et al.** *Ann. Rev. Biochem*, 1987, vol. 56, 881-914 [0117]
- **HUMPHREY et al.** *PNAS (USA)*, 1990, vol. 87, 4207-4211 [0117]
- 10 • **SEMBA et al.** *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0118]
- **YAMAMOTO et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0118]
- 15 • **KRAUS et al.** *PNAS (USA)*, 1989, vol. 86, 9193-9197 [0121]
- **PLOWMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0122]
- **PLOWMAN et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 473-475 [0122]
- 20 • **CLARK et al.** *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 1766 [0124]
- **PRESS et al.** *Blood*, 1987, vol. 69 (2), 584-591 [0125]
- 25 • **VALENTINE et al.** *Leukocyte Typing. Oxford University Press*, 1987, vol. III, 440 [0125]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI et al.** *The Molecular Basis of Cancer.* WB Saunders, 1995 [0128]
- 30 • **MOORE et al.** *Cytotechnology*, 1995, vol. 17, 1-11 [0130]
- **SIAS et al.** *J. Immunol. Methods*, 1990, vol. 132, 73-80 [0135]
- **WILMAN.** Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0141]
- 35 • Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA et al.** *Directed Drug Delivery. Humana Press*, 1985, 247-267 [0141]
- **DEISENHOFER.** *Biochemistry*, 1981, vol. 20 (9), 2361-2370 [0162]
- 40 • **BURMEISTER et al.** *Nature*, 1994, vol. 342, 379-383 [0162]
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0203]
- 45 • **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0215] [0219]
- **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0217]
- **BRODEUR et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0217]
- 50 • **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0222]
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0222]
- 55 • **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0223]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0225]
- 60 • **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0225]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0226]
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0226]
- 65 • **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0226] [0342]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0226]

ES 2 326 964 T3

- **JAKOBOVITS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0228]
- **JAKOBOVITS** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0228]
- 5 • **BRUGGERMANN** *et al. Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0228]
- **DUCHOSAL** *et al. Nature*, 1992, vol. 355, 258 [0228]
- **HOOGENBOOM** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0228]
- 10 • **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0228]
- **VAUGHAN** *et al. Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 309 [0228]
- 15 • **SEGAL** *et al. J. Immunol. Methods*, 2001, vol. 248, 1-6 [0229]
- **MILSTEIN** *et al. Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0230]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBD J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0230]
- 20 • **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0232]
- **TUTT** *et al. J. Immunol*, 1991, vol. 147, 60 [0234]
- 25 • **CHARI** *et al. Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0241] [0248]
- **CARLSSON** *et al. Biochem. J*, 1978, vol. 173, 723-737 [0241]
- **HINMAN** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0242]
- 30 • **LODE** *et al. Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0242]
- **FRAKER** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 80, 49-57 [0247]
- 35 • Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy. Chatal, *CRC Press*, 1989 [0247]
- **VITETTA** *et al. Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0248]
- **MASSEY**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0253]
- 40 • **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0254]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0255] [0313] [0315]
- 45 • **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0256]
- **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0256]
- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem*, 1982, vol. 257, 286-288 [0257]
- 50 • **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0257]
- **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0258]
- 55 • **ST JOHN** *et al. Chest*, 1993, vol. 103, 932 [0258]
- **KIM** *et al. Growth Factors*, 1992, vol. 7, 53-64 [0258]
- **STEPPE** *et al. Transplant Intl.*, 1991, vol. 4, 3-7 [0258]
- 60 • **HOURLMANT** *et al. Transplantation*, 1994, vol. 58, 377-380 [0258]
- **PRESTA** *et al. J. Immunol*, 1993, vol. 151, 2623-2632 [0258]
- 65 • **LORENZ** *et al. J. Immunol*, 1996, vol. 156 (4), 1646-1653 [0258]
- **DHAINAUT** *et al. Crit. Care Med.*, 1995, vol. 23 (9), 1461-1469 [0258]

ES 2 326 964 T3

- **CHOY** *et al. Arthritis Rheum*, 1996, vol. 39 (1), 52-56 [0258]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-337 [0258]
- 5 • **GRAZIANO** *et al. J. Immunol*, 1995, vol. 155 (10), 4996-5002 [0258]
- **SHARKEY** *et al. Cancer Res*, 1995, vol. 55 (23), 5935s-5945s [0258]
- **CERIANI** *et al. Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5852s-5856s [0258]
- 10 • **RICHMAN** *et al. Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5916s-5920s [0258]
- **LITTON** *et al. Eur J. Immunol*, 1996, vol. 26 (1), 1-9 [0258]
- 15 • **ELLIS** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155 (2), 925-937 [0258]
- **JURCIC** *et al. Cancer Res*, 1995, vol. 55 (23), 5908s-5910s [0258]
- **JUWEID** *et al. Cancer Res*, 1995, vol. 55 (23), 5899s-5907s [0258]
- 20 • **HOOGENBOOM** *et al. Mol. Immunol.*, 1991, vol. 28, 1027-1037 [0266]
- **ARUFFO** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 1303-1313 [0268]
- 25 • **STAMENKOVIC** *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 1133-1144 [0268]
- **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0279]
- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0279]
- 30 • **VAN DEN BERG**. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0280]
- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0280]
- 35 • **REYES** *et al. Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0286]
- **YANIV**. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0287]
- **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0293]
- 40 • **CHO, URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0293]
- **TM4, Mather**, *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0293]
- 45 • **MATHER** *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0293]
- **BEBBINGTON** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 169 [0293]
- **URLAUB** *et al. Somatic Cell and Molecular Genetics*, 1986, vol. 12, 555 [0293]
- 50 • **SIMONSEN** *et al. PNAS(USA)*, 1983, vol. 80, 2495-2499 [0293]
- **MILSTEIN** *et al. Nature*, 1983, vol. 537, 3053 [0294]
- 55 • **HAM** *et al. Meth. Enzym.*, 1979, vol. 58, 44 [0297]
- **BAINES** *et al. Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0297]
- **CLEVELAND** *et al. J. Immunol. Methods*, 1983, vol. 56, 221-234 [0300]
- 60 • **Animal Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press**, 1992 [0300]
- **CARTER** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0301]
- 65 • **LINDMARK** *et al. J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0302]
- **GUSS** *et al. EMBO J*, 1986, vol. 5, 1567-1575 [0302]

ES 2 326 964 T3

- **SHIELDS** *et al. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 9 (2), 6591-6604 [0305]
- **ANUMULA** *et al. Anal. Biochem.*, 1991, vol. 195, 269-280 [0309]
- 5 • **YAO** *et al. Anal Biochem.*, 1989, vol. 179, 332-335 [0310]
- **WARREN**, L. *J. Biol. Chem.*, 1959, vol. 238 (8 [0310]
- **HASELBECK** *et al. Glycoconjugate J.*, 1990, vol. 7, 63 [0311]
- 10 • **WORMALD** *et al. Biochem.*, 1997, vol. 36, 1370-1380 [0312]
- **SHEELEY** *et al. Anal. Biochem.*, 1997, vol. 247, 102-110 [0312]
- 15 • **CANT** *et al. Cytotechnology*, 1994, vol. 15, 223-228 [0312]
- *Current Protocols in Immunology*. Wiley-Interscience, 1991, vol. 1, 2 [0321]
- Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay. **O'SULLIVAN**
- 20 *et al. Methods in Enzym. Academic press*, 1981, vol. 73, 147-166 [0321]
- **ZOLA**. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. *CRC Press, Inc.*, 1987, 147-158 [0326]
- M.C. **PERRY**. Chemotherapy Service Ed. *William & Wilkins*, 1992 [0337]
- 25 • **RIPKA** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, vol. 249, 533-545 [0341]
- **LUCAS** *et al. Nucl. Acid Res.*, 1996, vol. 24, 1774-1779 [0342]
- 30 • **PAPAC** *et al. Glycobiology*, 1998, vol. 8, 445-454 [0346]
- **WALKER** *et al. Biochem. J.*, 1989, vol. 259, 347-353 [0349]
- **KUMPEL** *et al. Human Antibod. Hybridomas*, 1994, vol. 5, 143-151 [0349]
- 35 • **TSUCHIYA** *et al. J. Rheumatol.*, 1989, vol. 16, 285-290 [0349] [0362]
- **CLARK** *et al. J. Immunol.*, 1989, vol. 143, 1731-1734 [0350]
- 40 • **SHIELDS** *et al. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604 [0350] [0353] [0353] [0366]
- **WU** *et al. J. Clin Invest.*, 1997, vol. 100, 1059-1070 [0350]
- **BURMEISTER** *et al. Nature*, 1994, vol. 372, 379-383 [0356]
- 45 • **RAGHAVAN** *et al. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996, vol. 12, 181-220 [0356]
- **SHIELDS** *et al. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (9), 6591-6604 [0360]
- 50 • **SONDERMANN** *et al. Nature*, 2001, vol. 406, 267-273 [0360]
- **MAKRIDES**, S. C. *Pharmacol. Rev.*, 1998, vol. 50, 59-87 [0362]
- **BOYD** *et al. Molec. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1311-1318 [0362]
- 55 • **HUDZIAK** *et al. Mol. Cell Biol.*, 1989, vol. 9, 1165-1172 [0363]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una glicoproteína que tiene una región Fc de IgG humana, donde aproximadamente el 51-100% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidratos central madura que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glicoproteína, donde la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de IgG humana de secuencia nativa, y donde la glicoproteína se une a FcγRIII con mejor afinidad, o media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de manera más eficaz, que la glicoproteína con una estructura de carbohidrato central madura que incluye fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácidos 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 ó 430, utilizando la numeración EU para los residuos de la región Fc.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2, donde la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos en cualquiera de dos o tres de los residuos en las posiciones 298, 333 y 334.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, donde la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 298, 333 y 334.
5. Composición según la reivindicación 4, donde los residuos de sustitución en las posiciones 298, 333 y 334 son alanina.
- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde aproximadamente el 80-100% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glicoproteína.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la glicoproteína comprende un anticuerpo.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la región Fc de IgG humana comprende una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
9. Composición según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un marcador de superficie de células B, un receptor ErbB, un antígeno asociado a tumor y un factor angiogénico.
- 40 11. Composición según la reivindicación 10, donde el anticuerpo se une a CD20, HER2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD40 o antígeno de células madre de próstata (PSCA).
12. Composición según la reivindicación 11, donde el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-HER2 humanizado, un anticuerpo anti-CD20 humanizado y un anticuerpo anti-VEGF humanizado.
- 45 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde aproximadamente el 90-99% de la glicoproteína en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glicoproteína.
- 50 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la glicoproteína ha sido producida por una célula de ovario de hámster chino (CHO).
15. Composición según la reivindicación 14, donde la célula CHO es una célula Lec13.
- 55 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la glicoproteína está esencialmente libre N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc) unida a la estructura de carbohidrato central madura.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la glicoproteína tiene N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc) unida a la estructura de carbohidrato central madura.
- 60 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16 ó 17, donde la glicoproteína tiene uno o más residuos de galactosa unidos a la estructura de carbohidrato central madura.
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16 ó 17, donde la glicoproteína está esencialmente libre de uno o más residuos de galactosa unidos a la estructura de carbohidrato central madura.
- 65

ES 2 326 964 T3

20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 16 a 19, donde la glicoproteína tiene uno o más residuos de ácido siálico unidos a la estructura de carbohidrato central madura.

21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 ó 16 a 19, donde la glicoproteína está esencialmente libre de uno o más residuos de ácido siálico unidos a la estructura de carbohidrato central madura.

22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una preparación farmacéutica.

23. Preparación farmacéutica según la reivindicación 22, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

24. Composición según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que es estéril.

25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, que está liofilizada.

26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la glicoproteína es una inmunoadhesina.

27. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para su uso en un método de tratamiento de un mamífero mediante la administración de la composición para tratar una enfermedad o trastorno en el mamífero que se beneficiaría de dicho tratamiento.

28. Composición según la reivindicación 27 donde el mamífero es humano.

29. Composición según la reivindicación 28 donde el humano expresa FcγRIII(F158).

30. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, una infección u otra afección donde se desea la eliminación de células o tejido.

31. Célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica una glicoproteína que comprende una región Fc, tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 a 12 ó 16 a 21, donde aproximadamente el 80-100% de la glicoproteína producida por la célula huésped comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glicoproteína.

32. Célula huésped según la reivindicación 31, que es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

33. Células huésped según la reivindicación 32, que es una célula Lec13.

34. Método para producir una glicoproteína que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, de manera que se expresa el ácido nucleico.

35. Método según la reivindicación 34, que comprende además recuperar la glicoproteína del cultivo de células huésped.

36. Método según la reivindicación 34, que comprende además conjugar la glicoproteína a una molécula heteróloga.

37. Método según la reivindicación 36, donde la molécula heteróloga es un agente citotóxico o una enzima.

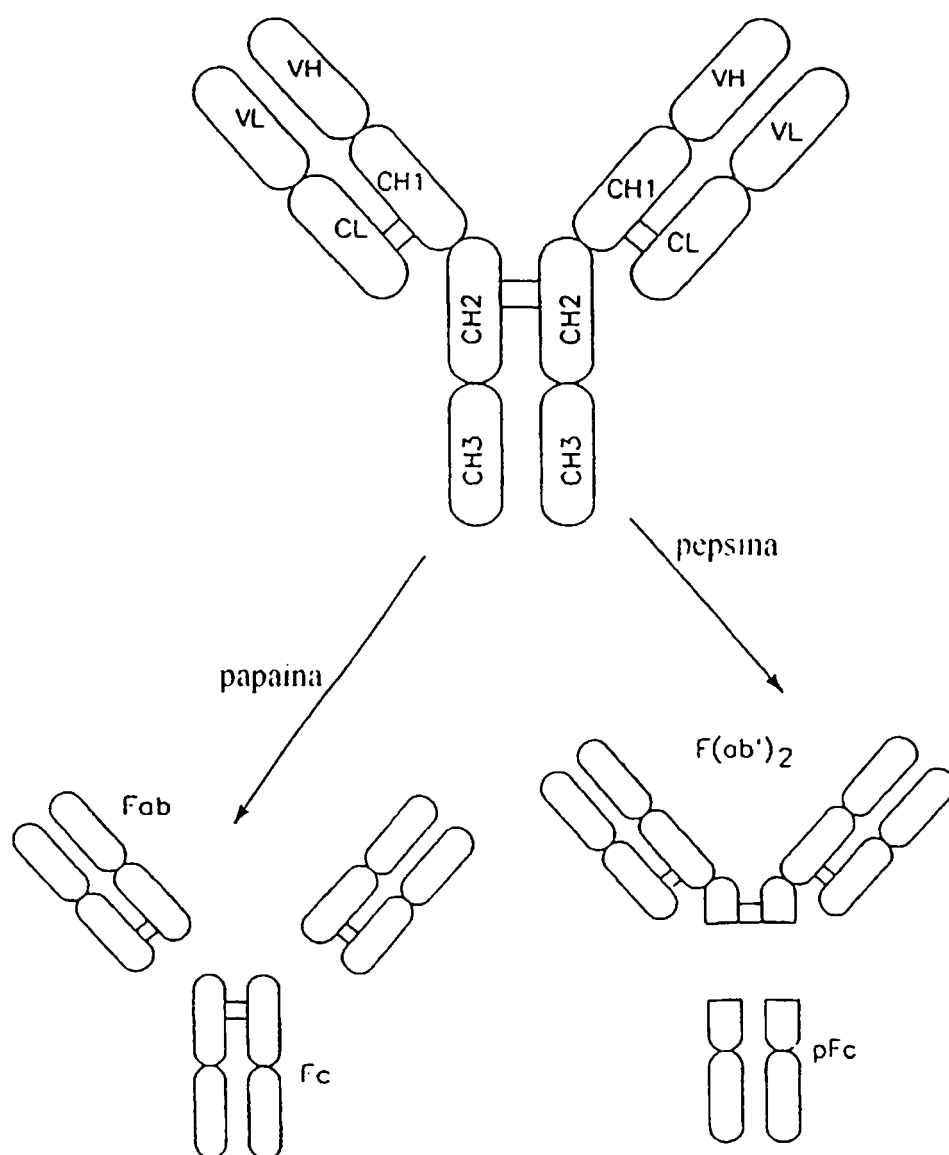


FIG. 1A

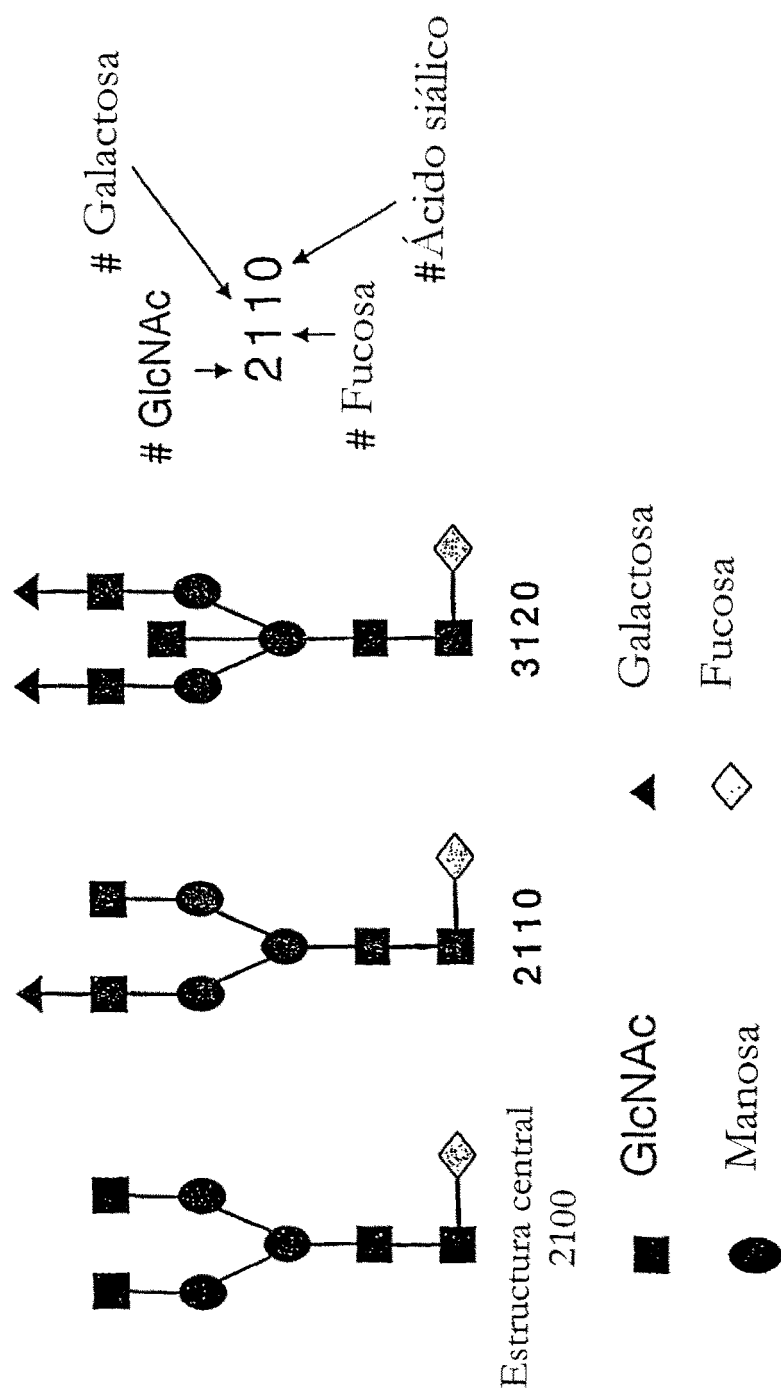
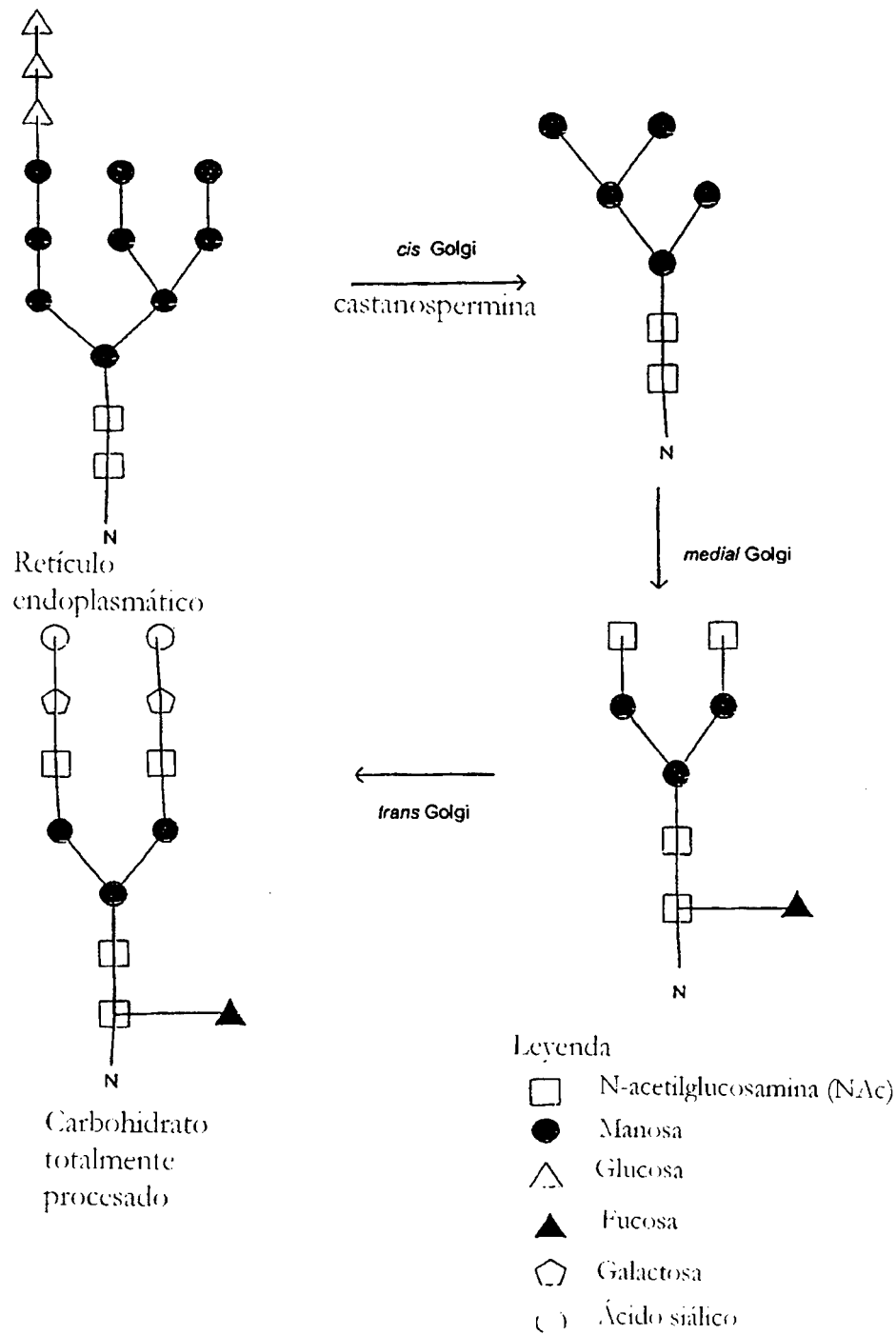


FIG. 1B

FIG. 2



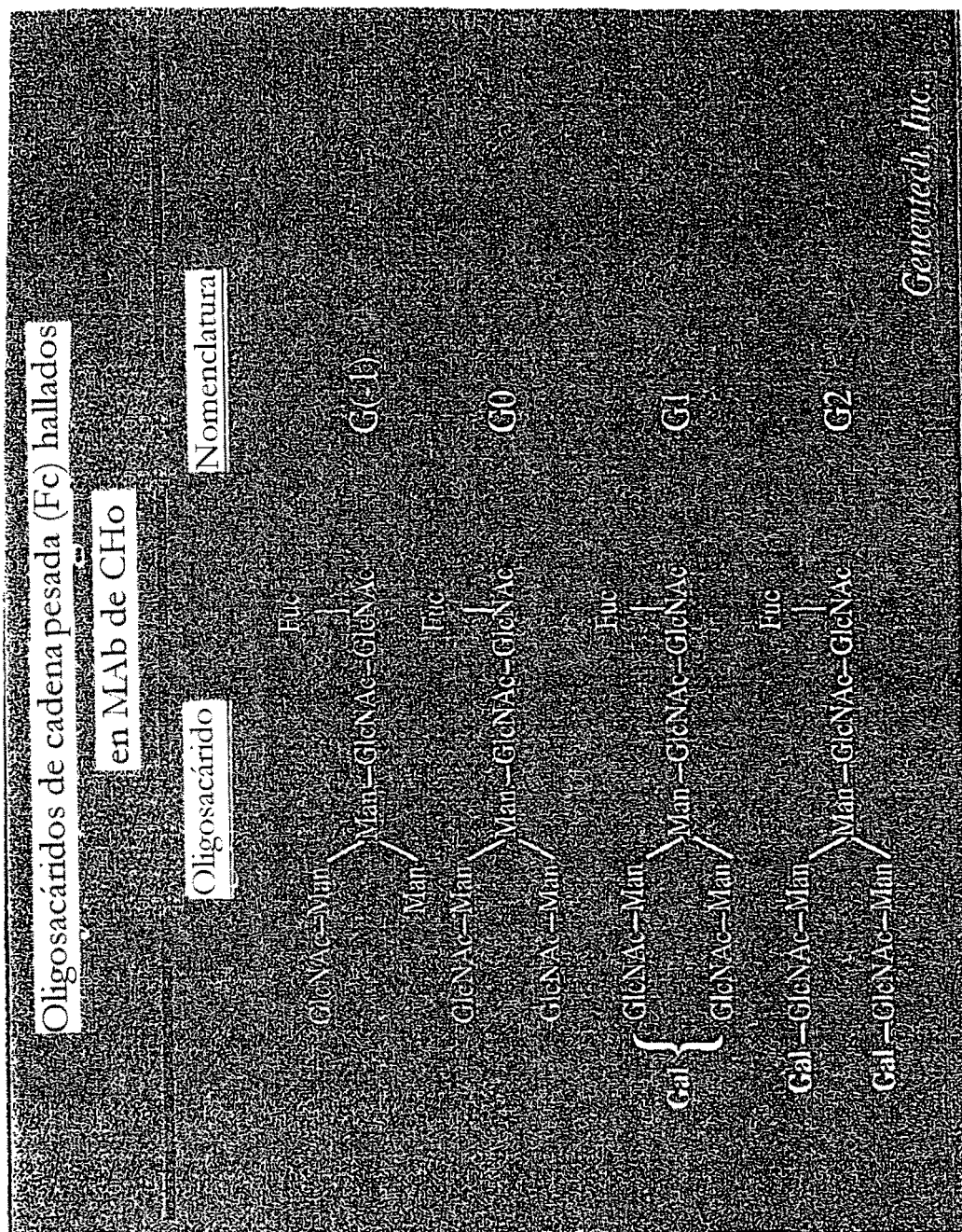


FIG. 3

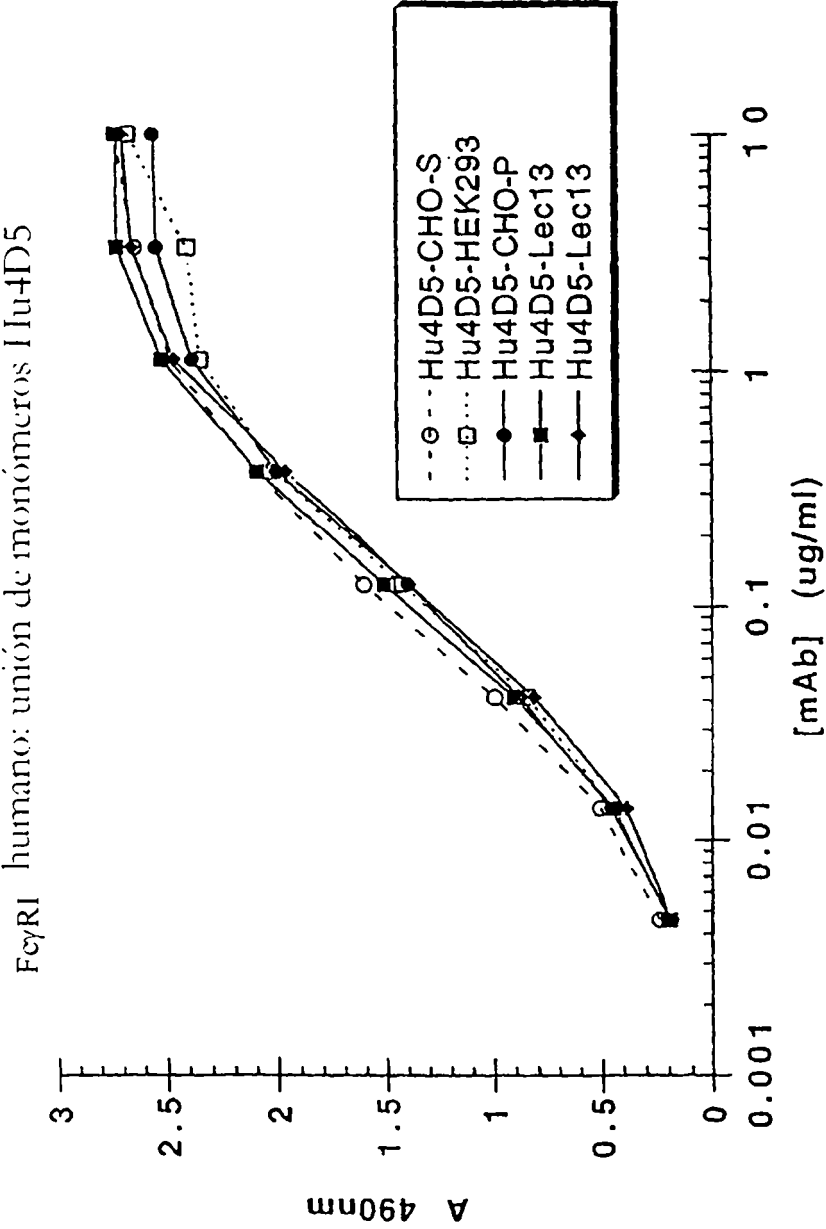


FIG. 4

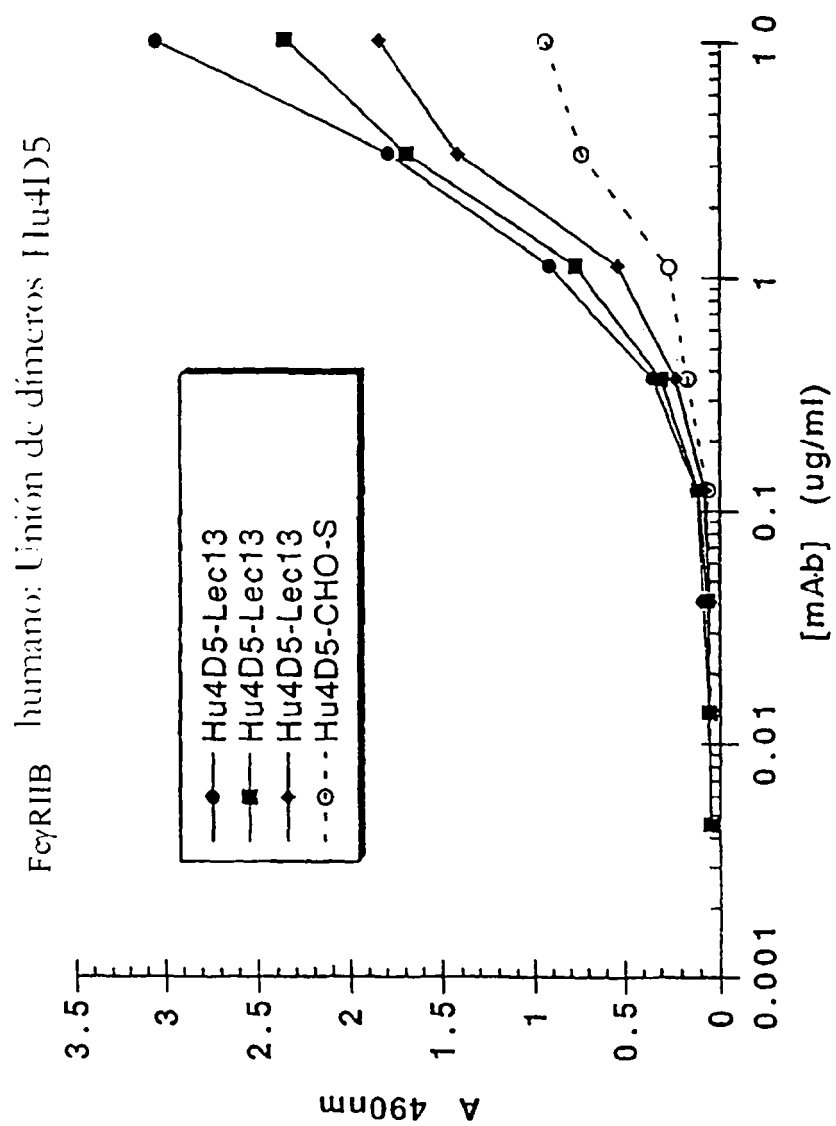


FIG. 5

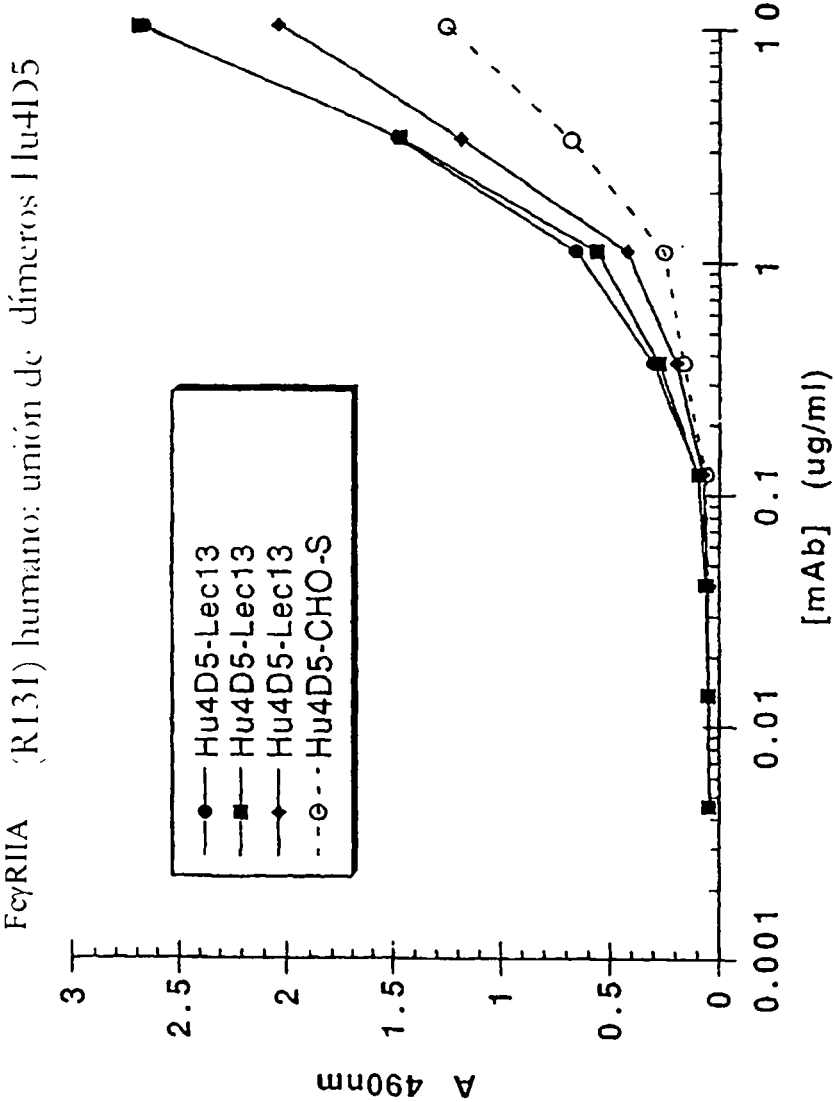


FIG. 6

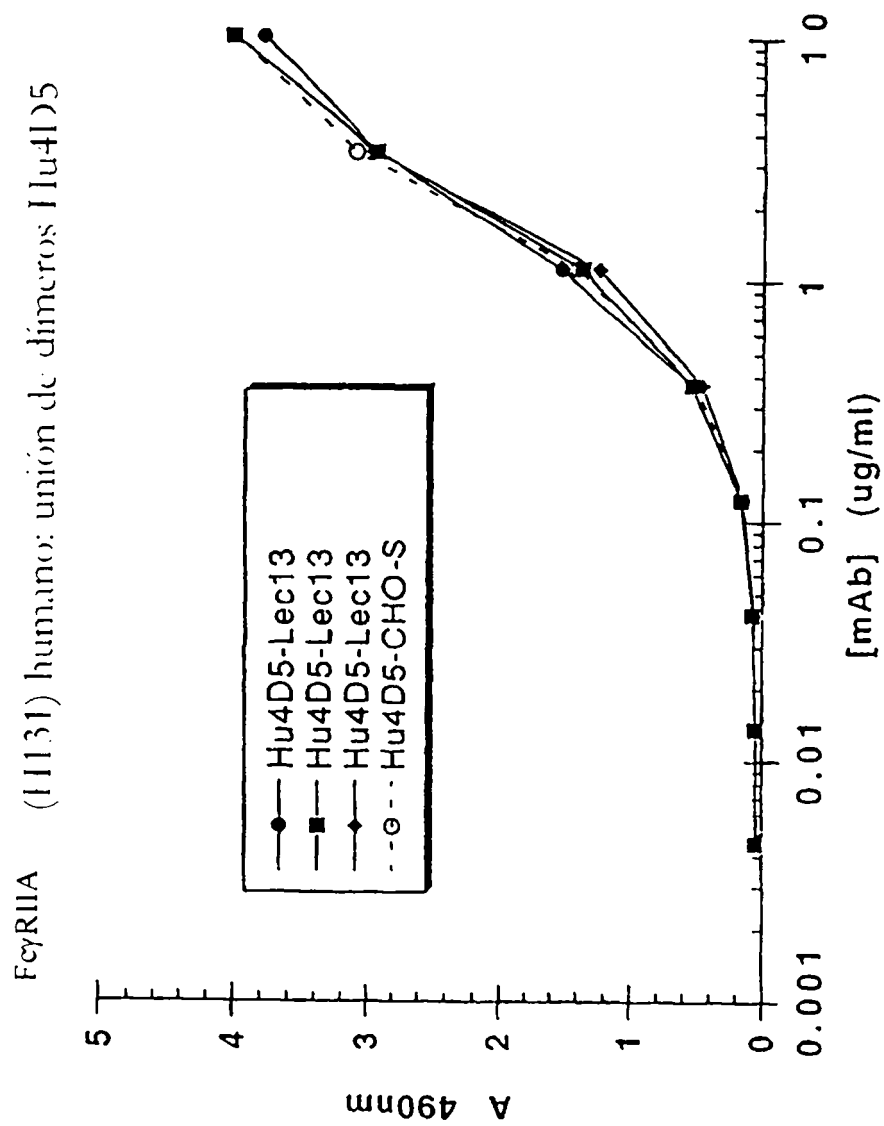


FIG. 7

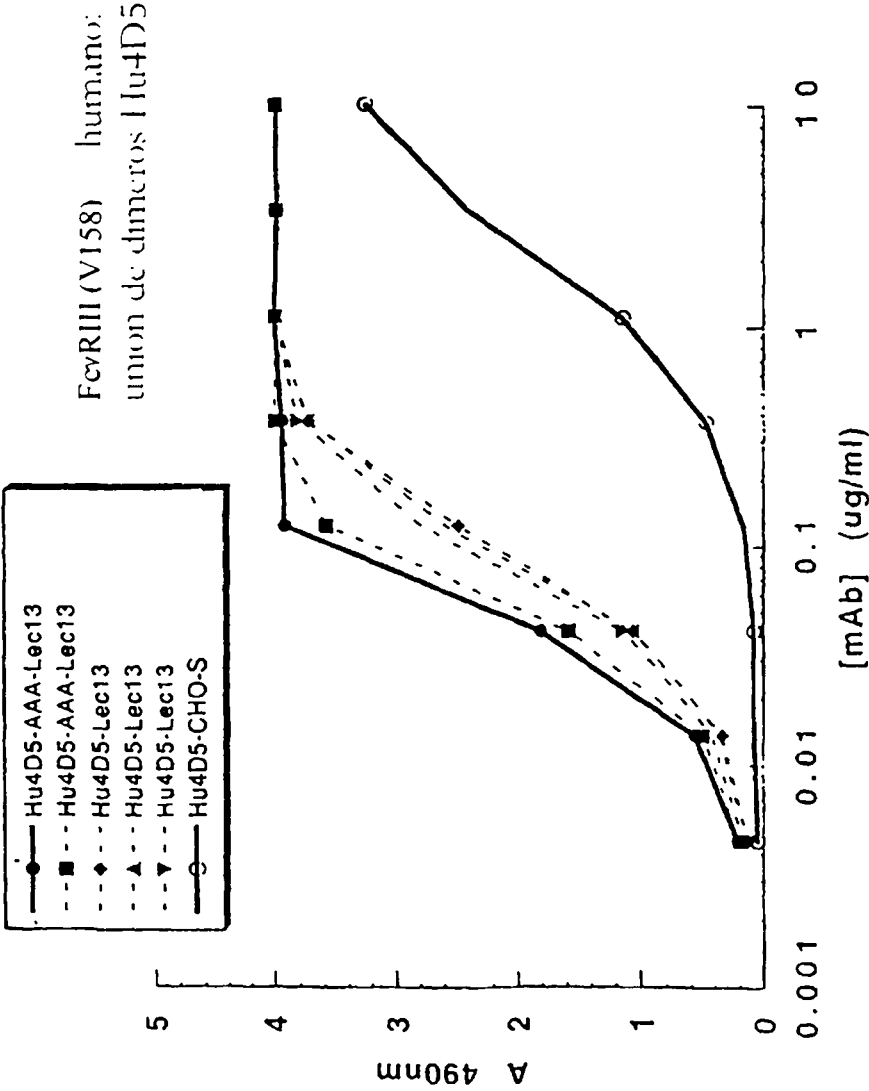


FIG. 8

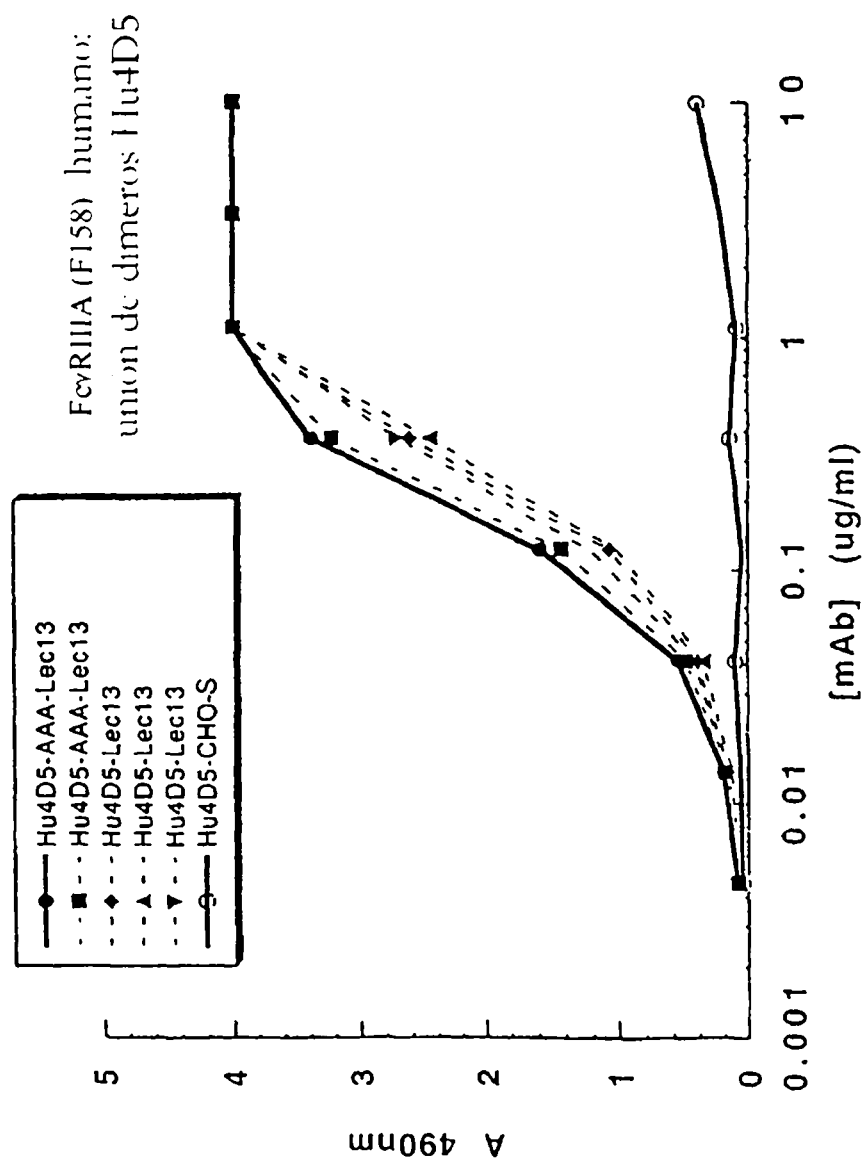


FIG. 9

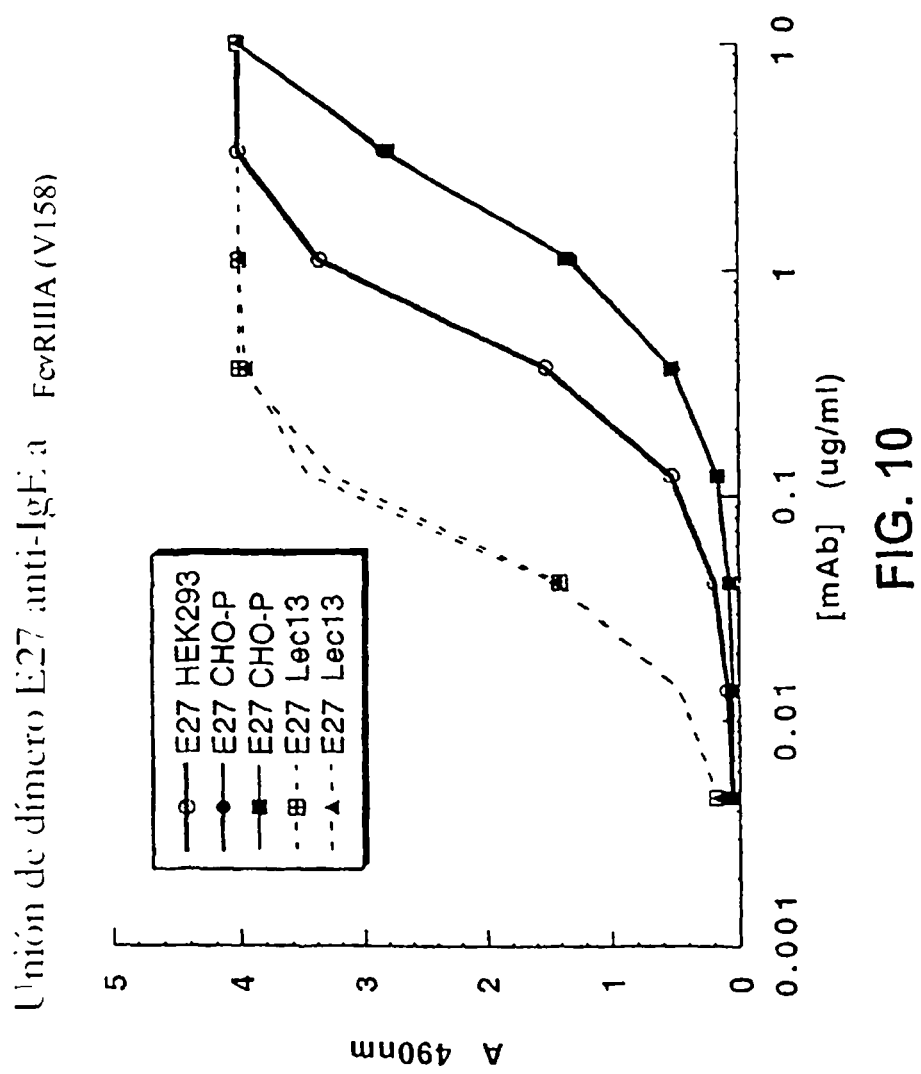


FIG. 10

Unión de dímeros E27 anti-IgE a | Fc γ RIIIA (F158) humano

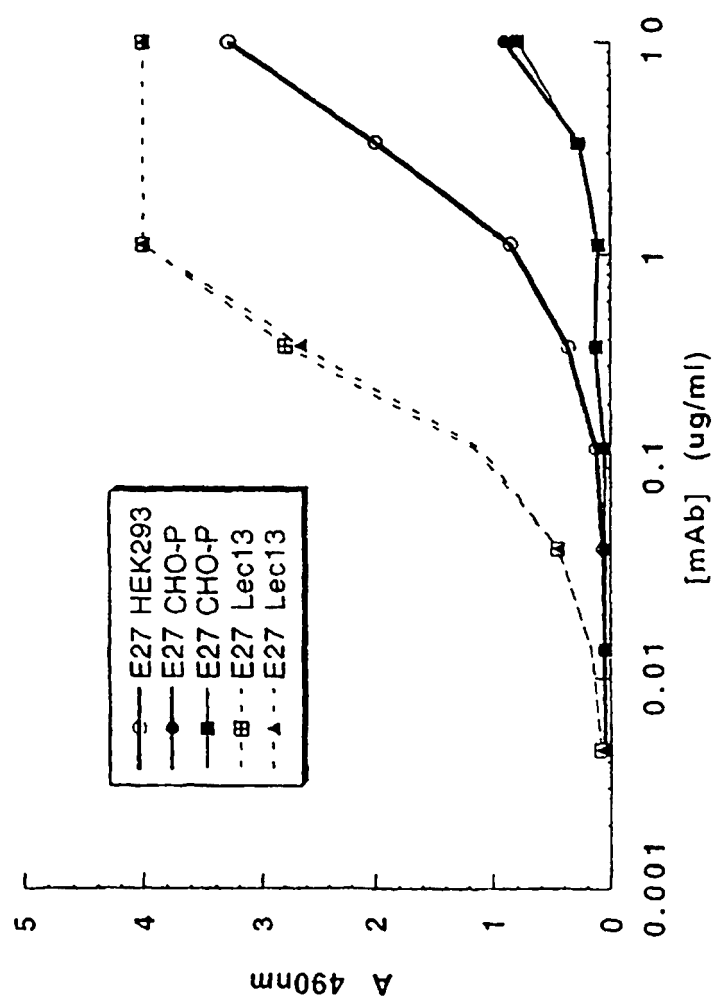


FIG. 11

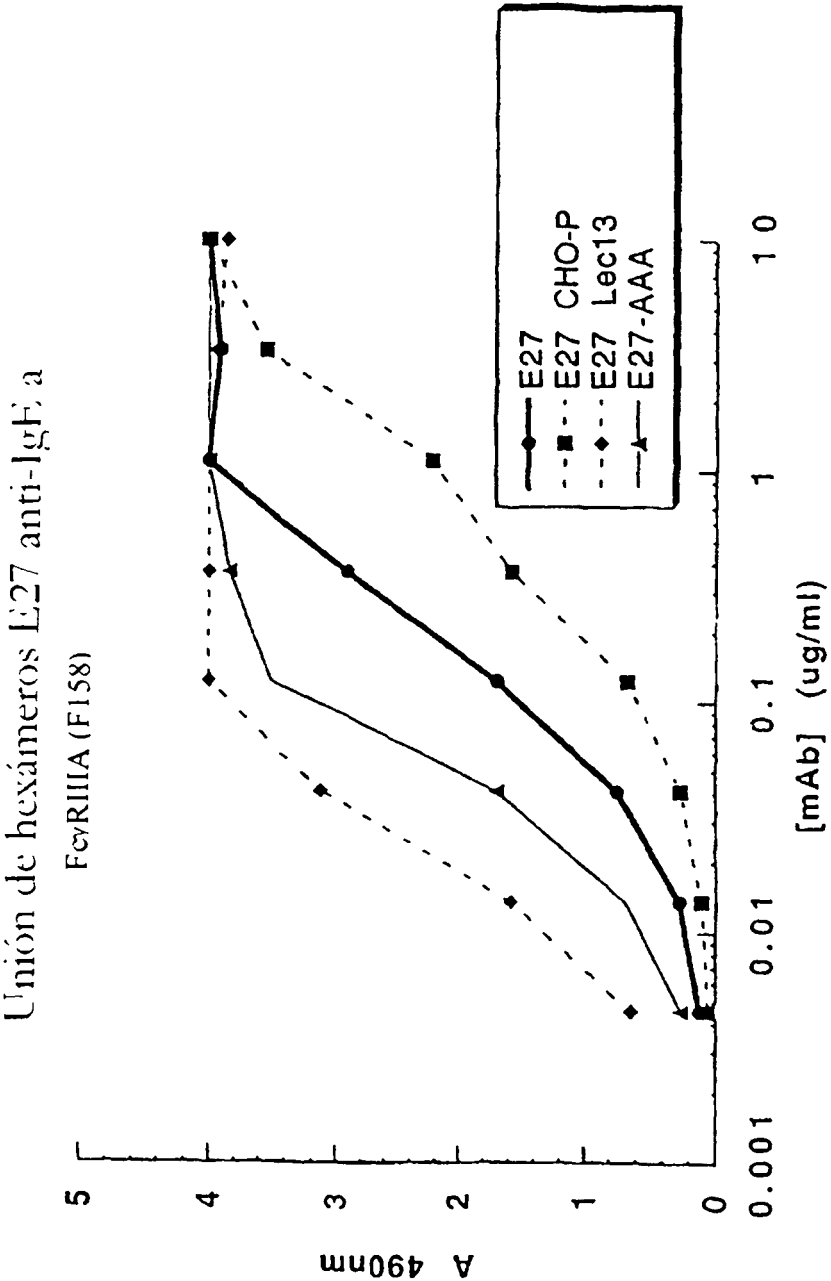


FIG. 12

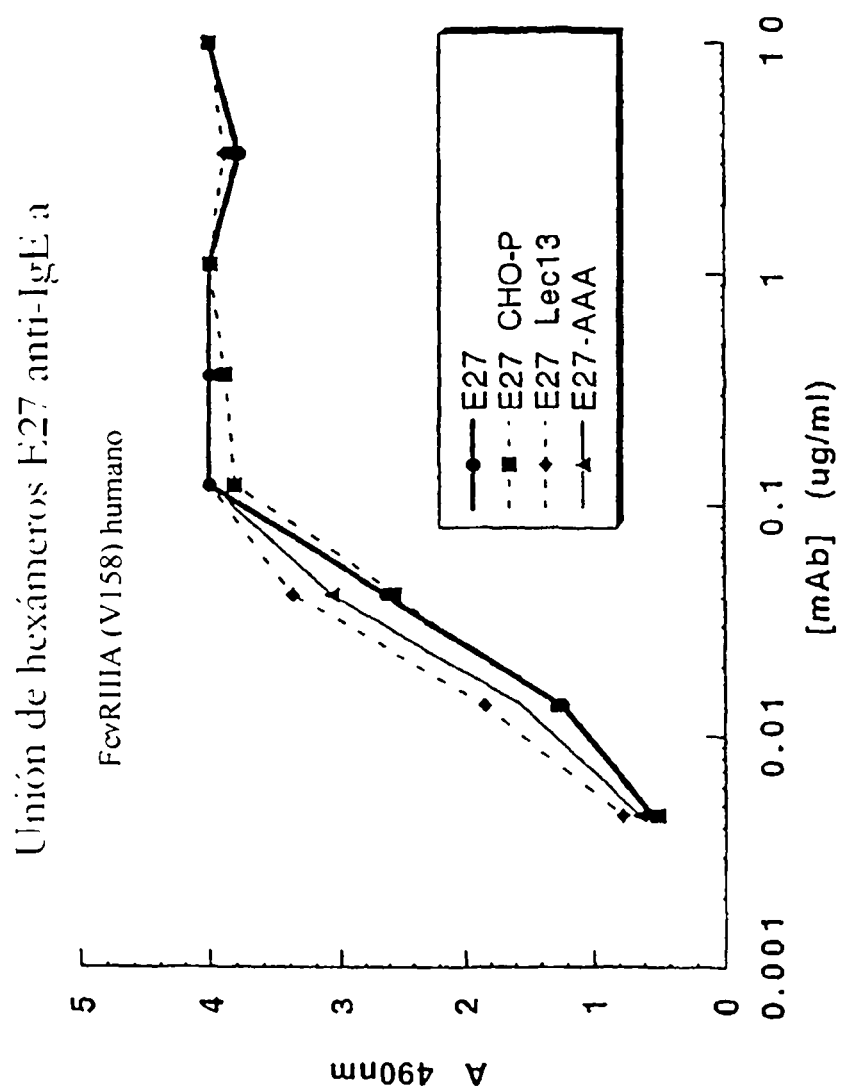


FIG. 13

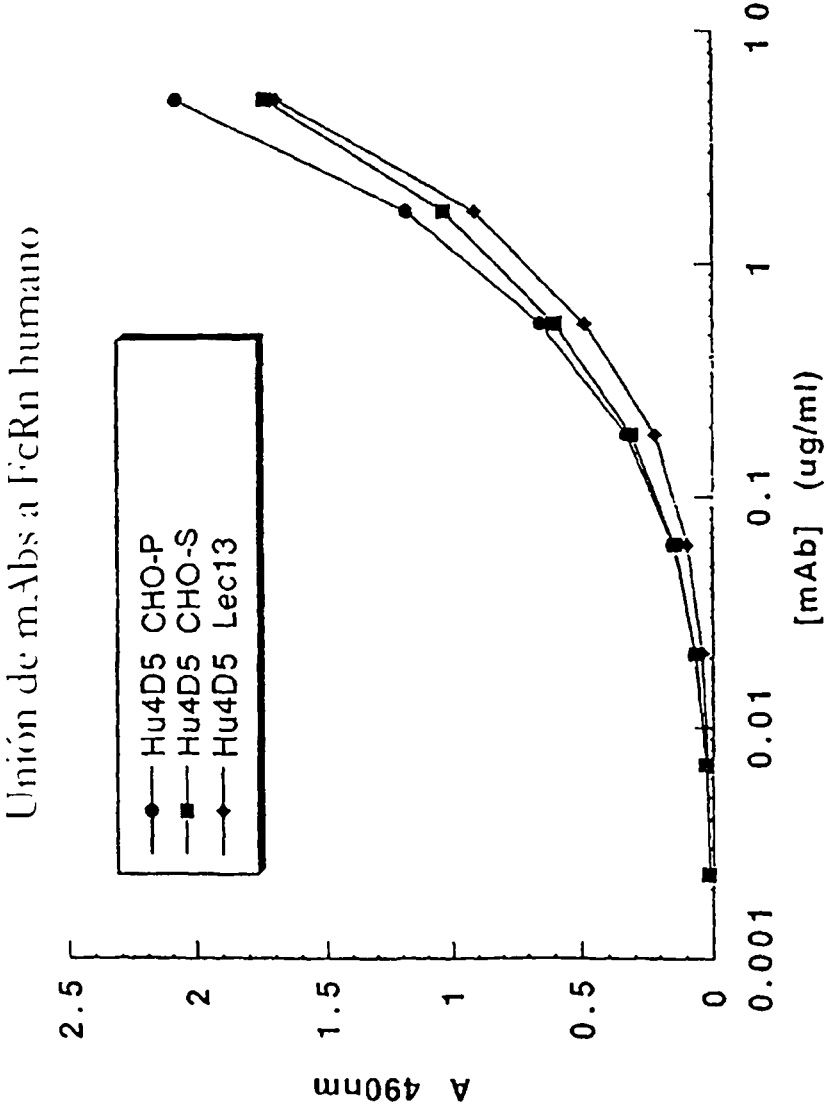


FIG. 14

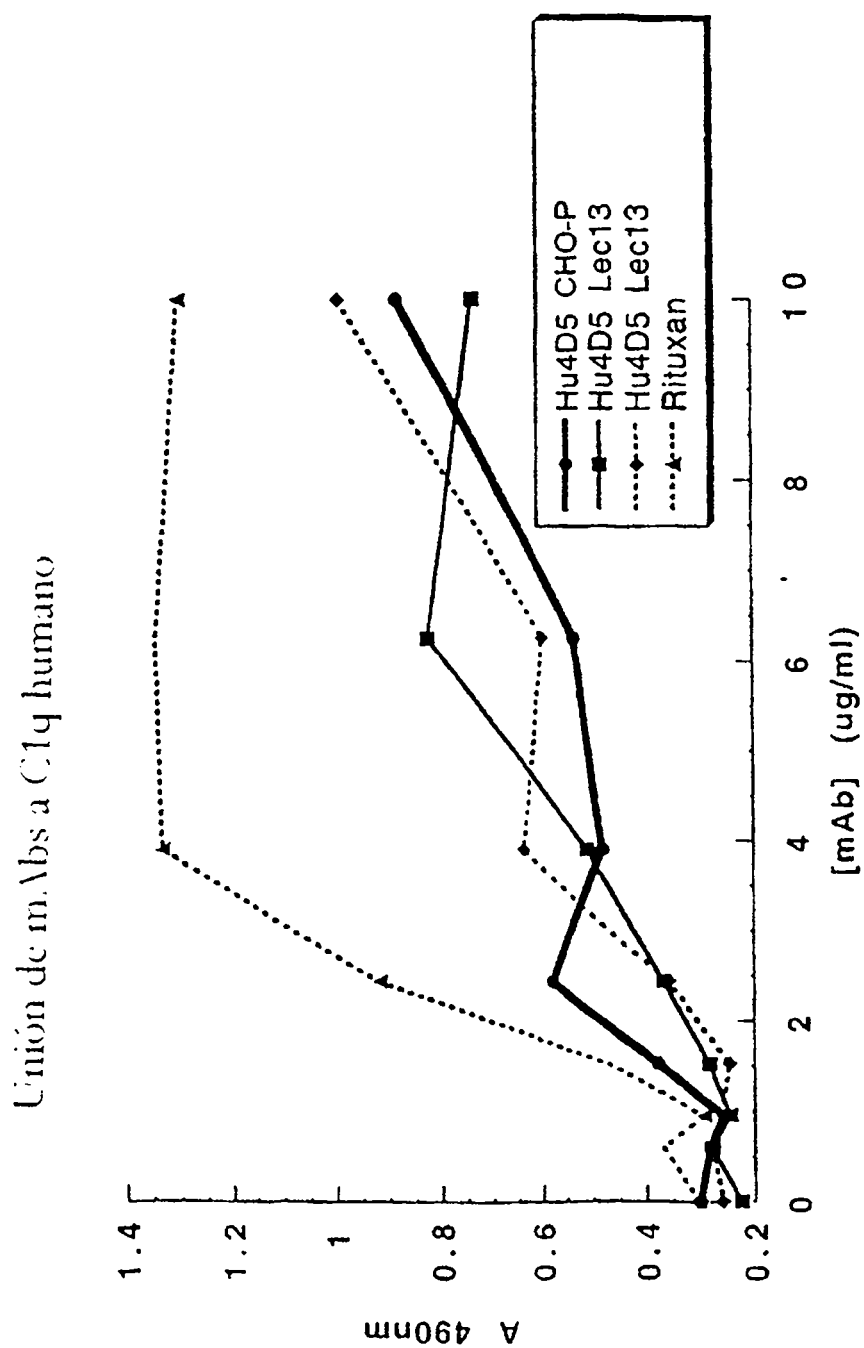


FIG. 15

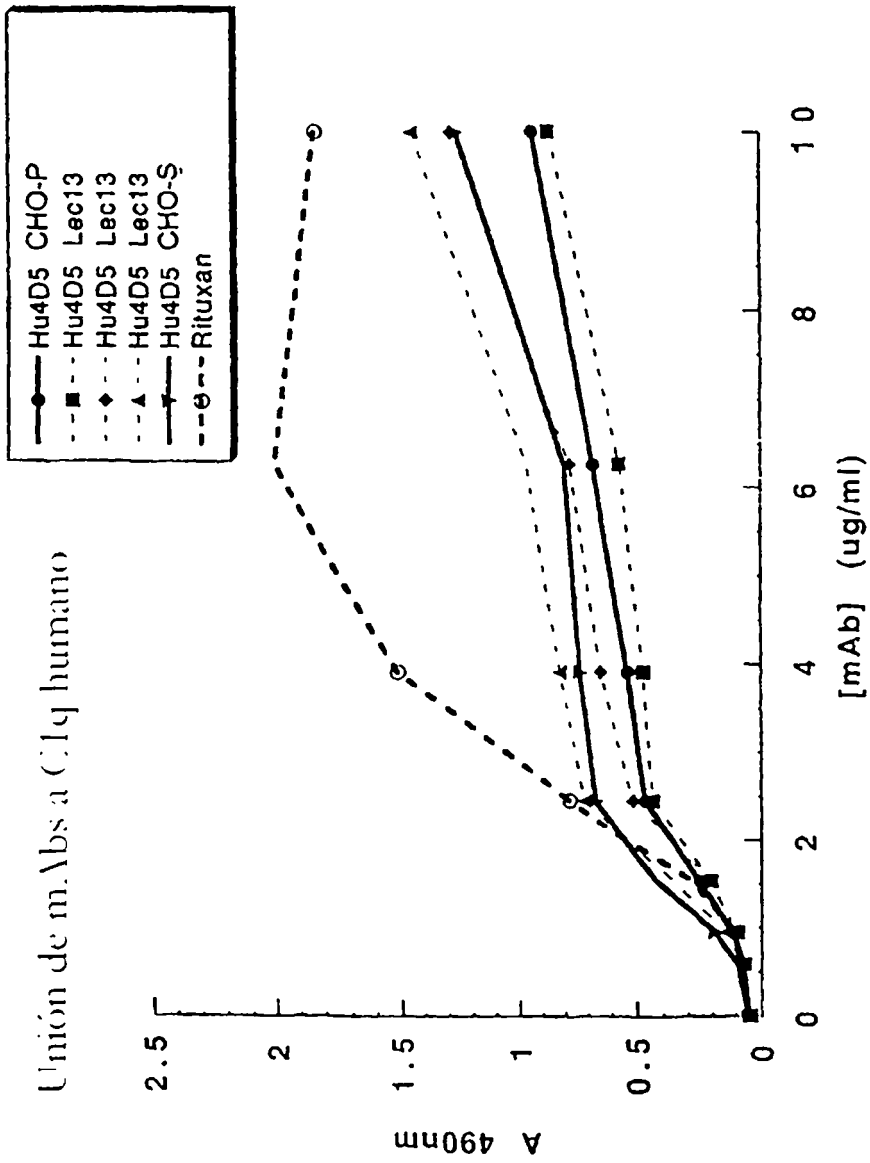


FIG. 16

ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1)
Dador 0557 (FcγRIII/IV)

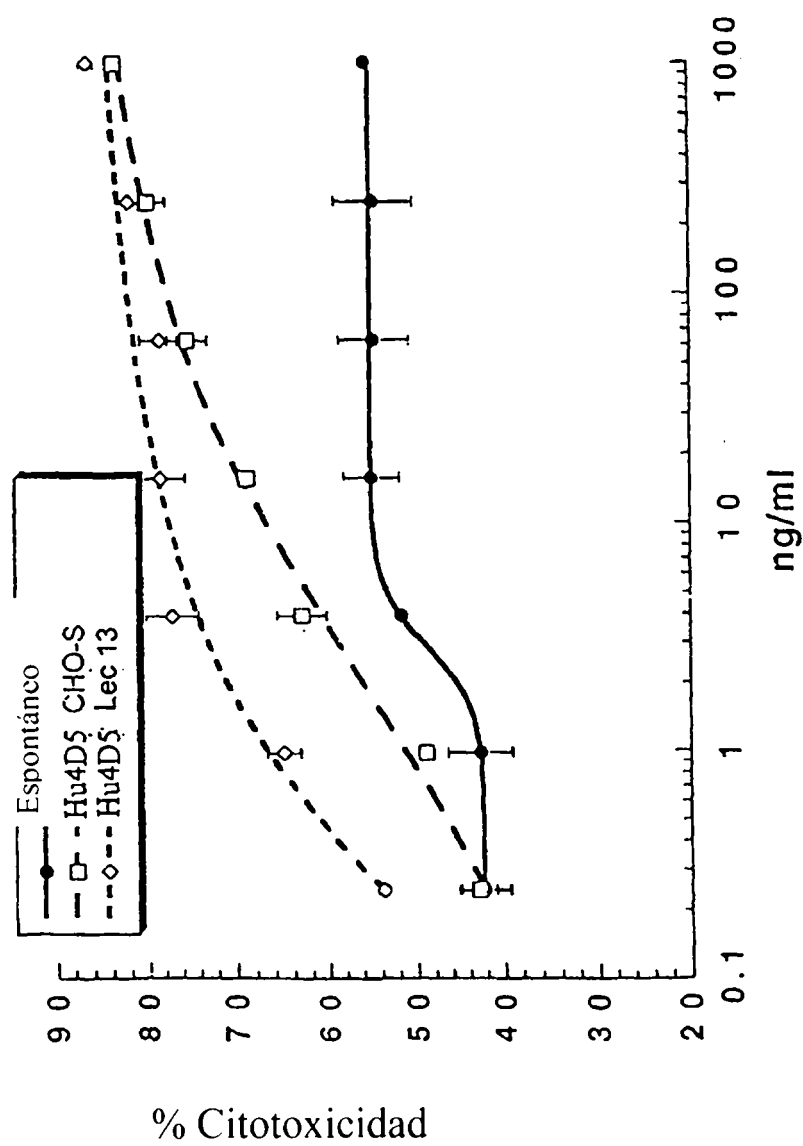


FIG. 17

ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T 30:1)
Dador 8059 (FcγRIII/IV)

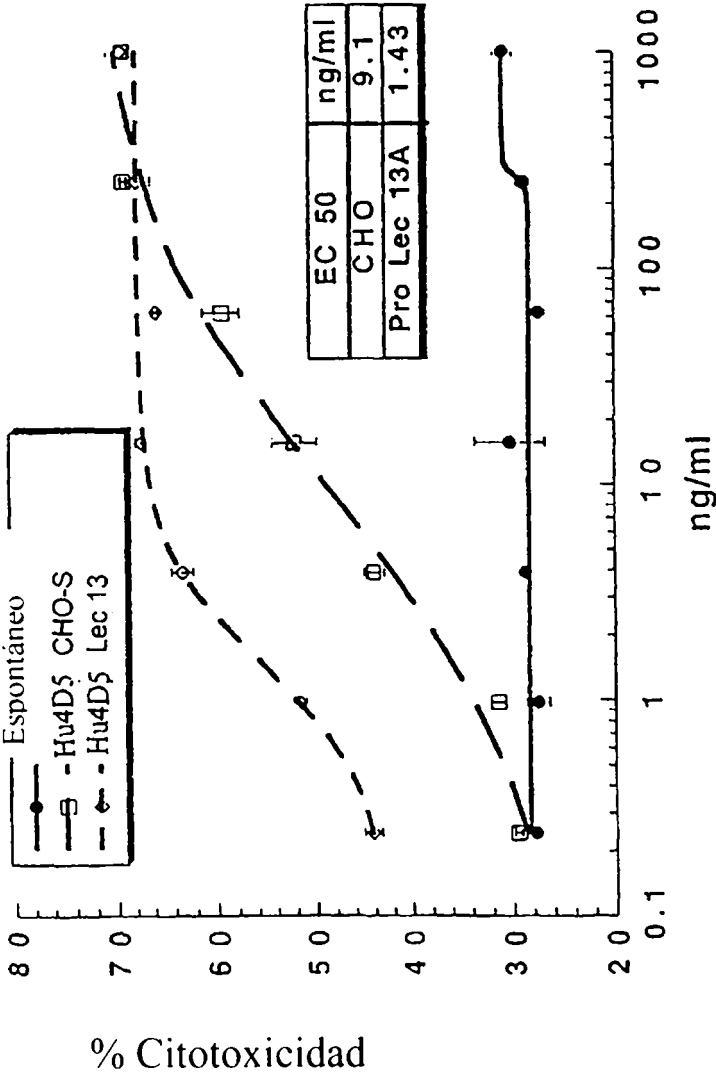


FIG. 18

ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T30:1)
Dador 9123 (FcγRIIIIF)

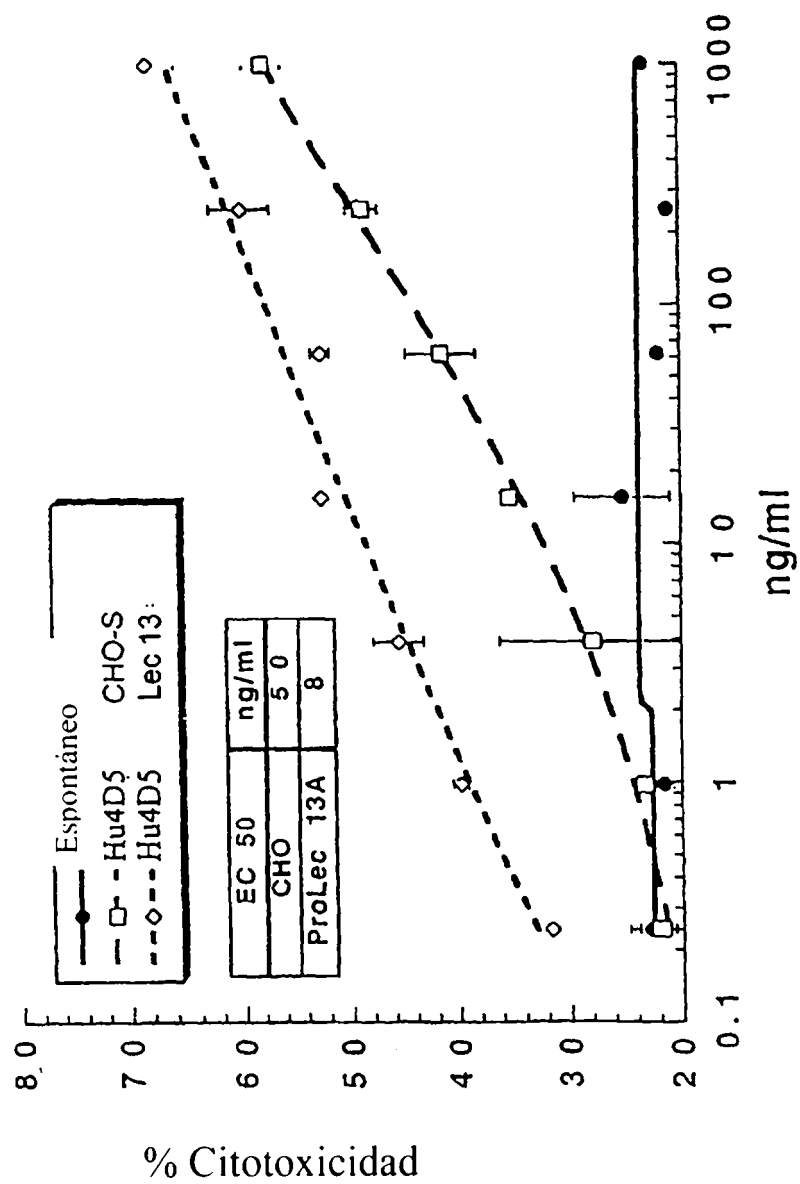


FIG. 19

ADCC de PBMC en células tumorales de mama SKBR3 (E:T30:1)
Dador 1497 (FcγRIIIIF)

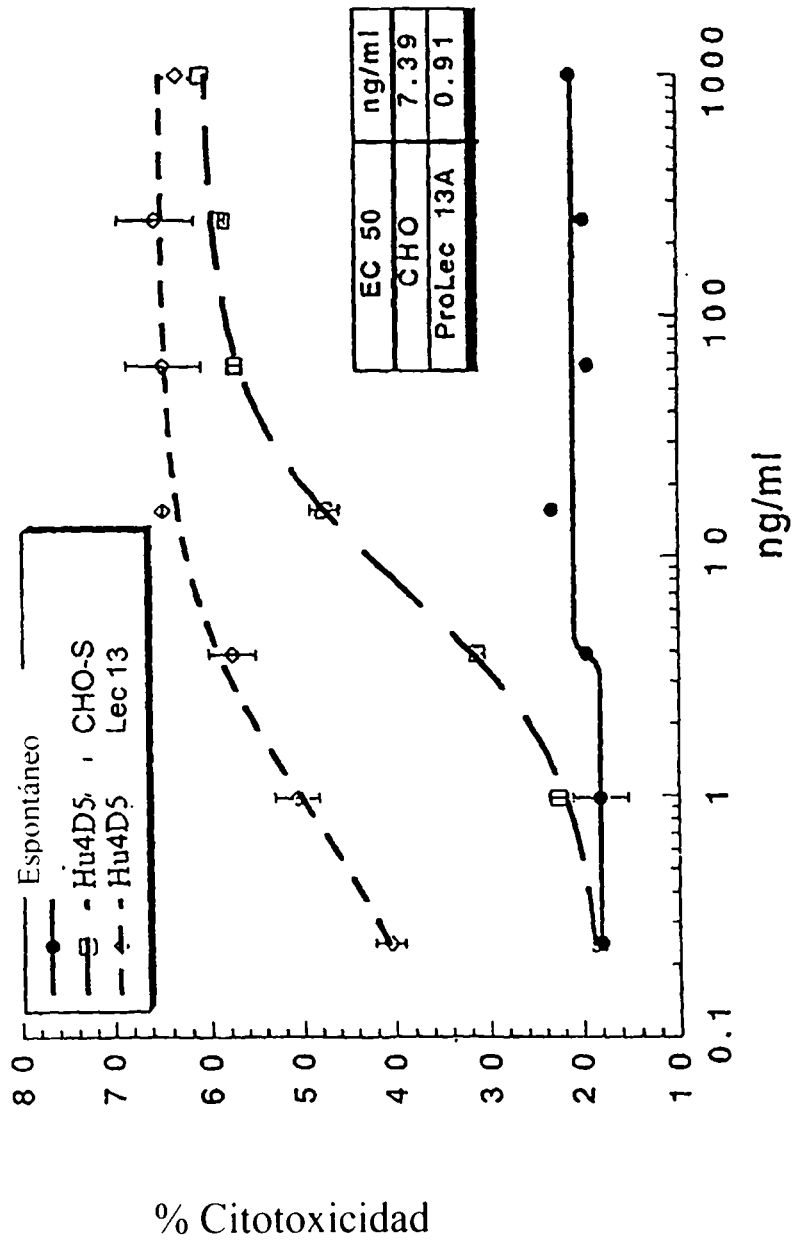


FIG. 20

ADCC de monocito en células tumorales de mama SKBR3 (E:T30:1)
Dador 8764 (Fc γ RIIA RR)

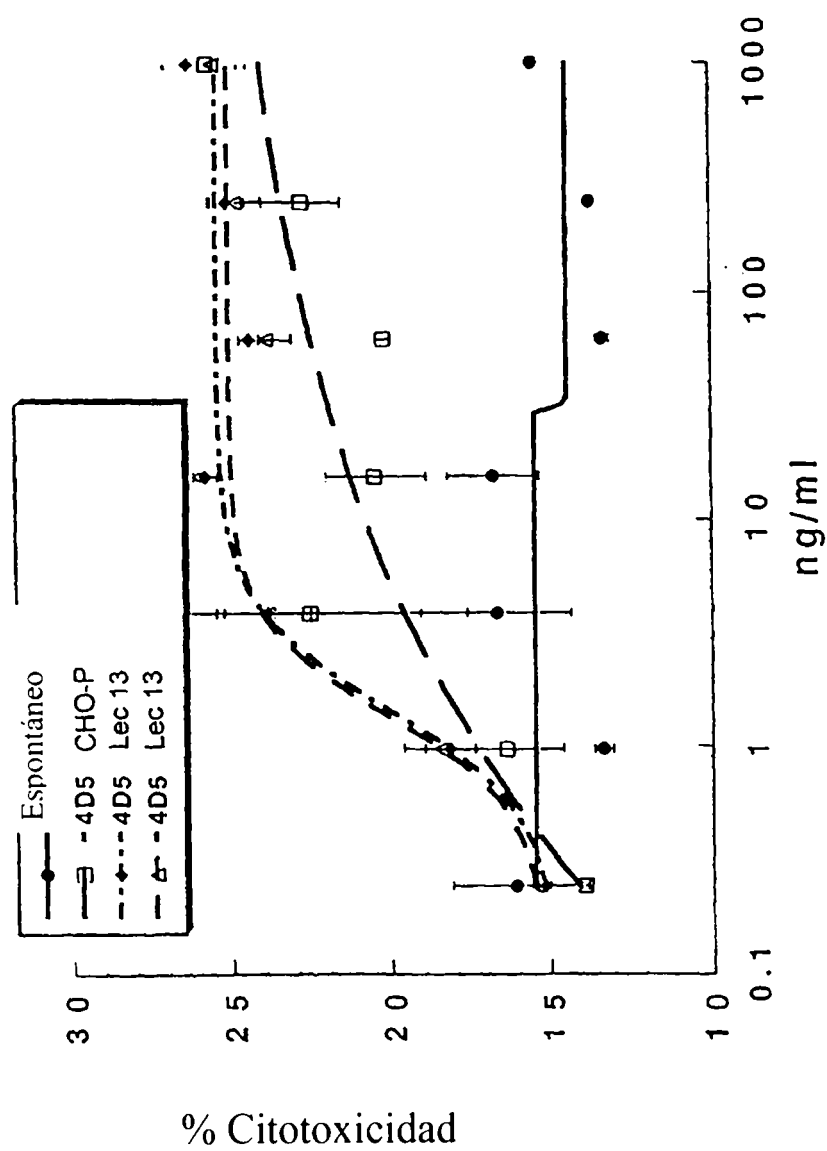


FIG. 21

ADCC de monocito en células tumorales de mama SKBR3 (E:T30:1)
 Dador 9730 (Fc γ RIIA 2HH)

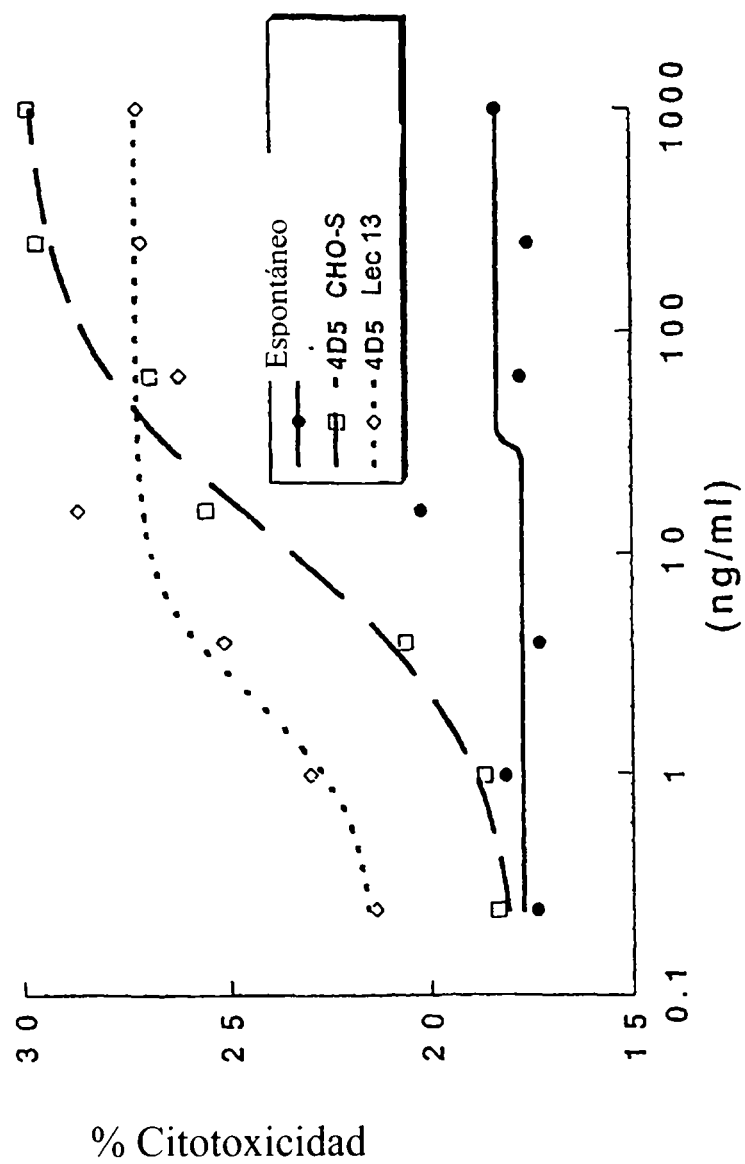


FIG. 22

ES 2 326 964 T3

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYV				
murIgG1	---TVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFV				
murIgG2A	PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG2B	PAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISSLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG3	PPGNILGGPSVFIFPPKPKDALMISSLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVHVSWFV				
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
murIgG1	DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFP				
murIgG2A	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLP				
murIgG2B	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSHPPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLP				
murIgG3	DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQQDWMRGKEFKCKVNNKALP				
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
murIgG1	APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV				
murIgG2A	APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV				
murIgG2B	SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV				
murIgG3	APIERTISKPKGRAQTPQVYTIPPPREQMSKKKVSALTCLVTNFFSEAI SV				
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH				
humIgG4	EWZSNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH				
murIgG1	EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLH				
murIgG2A	EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH				
murIgG2B	EWTNNGHTEENYKDTAPVLDSGDSYFIYSKLVNMKTSKWEKTDTSFSCNVRH				
murIgG3	EWERNGELEQDYKNTPPILDSGDTYFLYSKLVDTDSWLQGEIFTCSVVH				
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
murIgG1	EGLHNHHTTEKSLSHSPGK				
murIgG2A	EGLHNHHTTKSFSRTPGK				
murIgG2B	EGLKNYYLKKTISRSPGK				
murIgG3	EALHNHHTQKNLSRSPGK				

FIG. 23

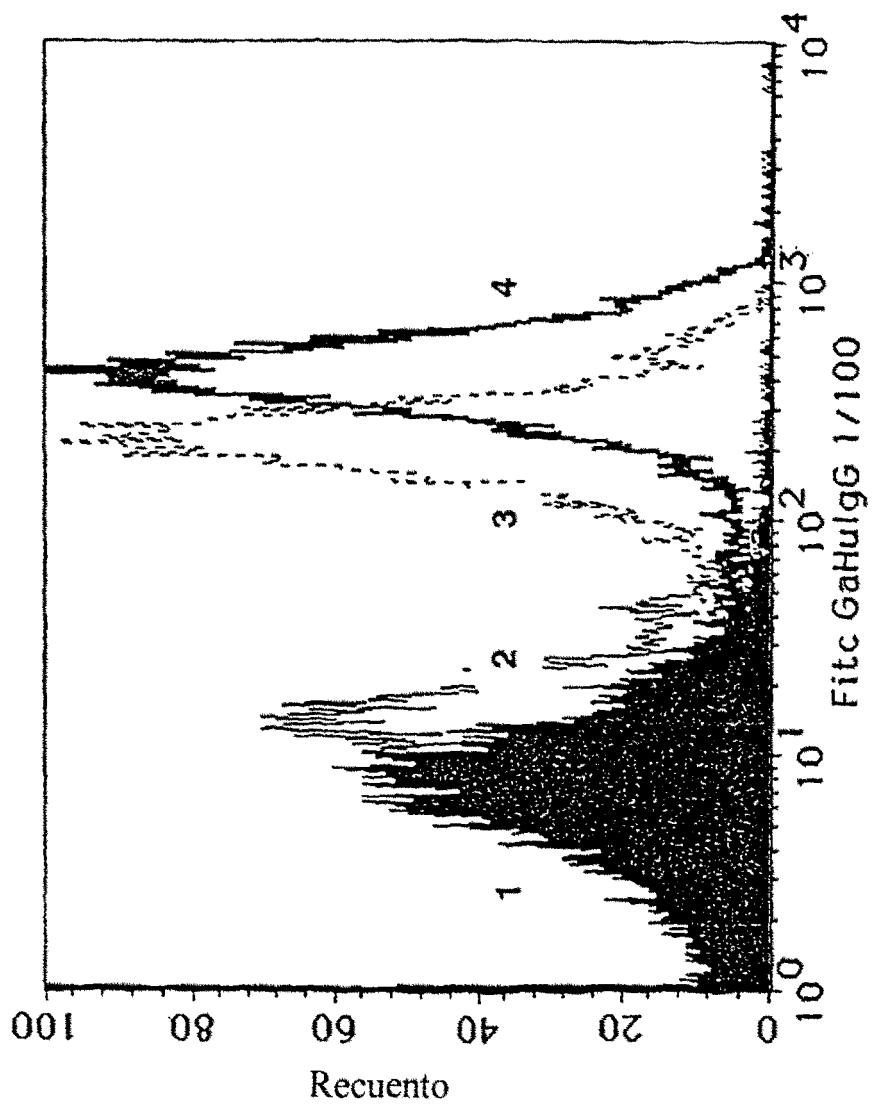


FIG. 24

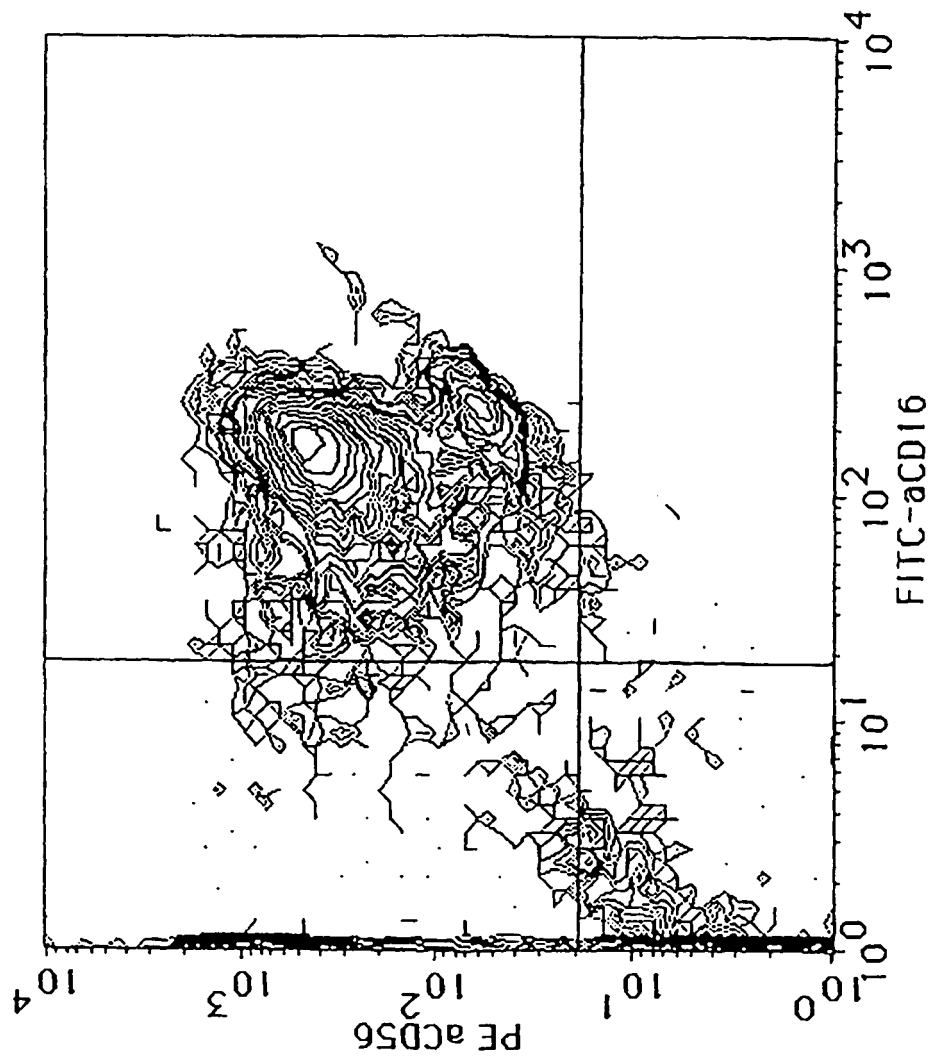


FIG. 25

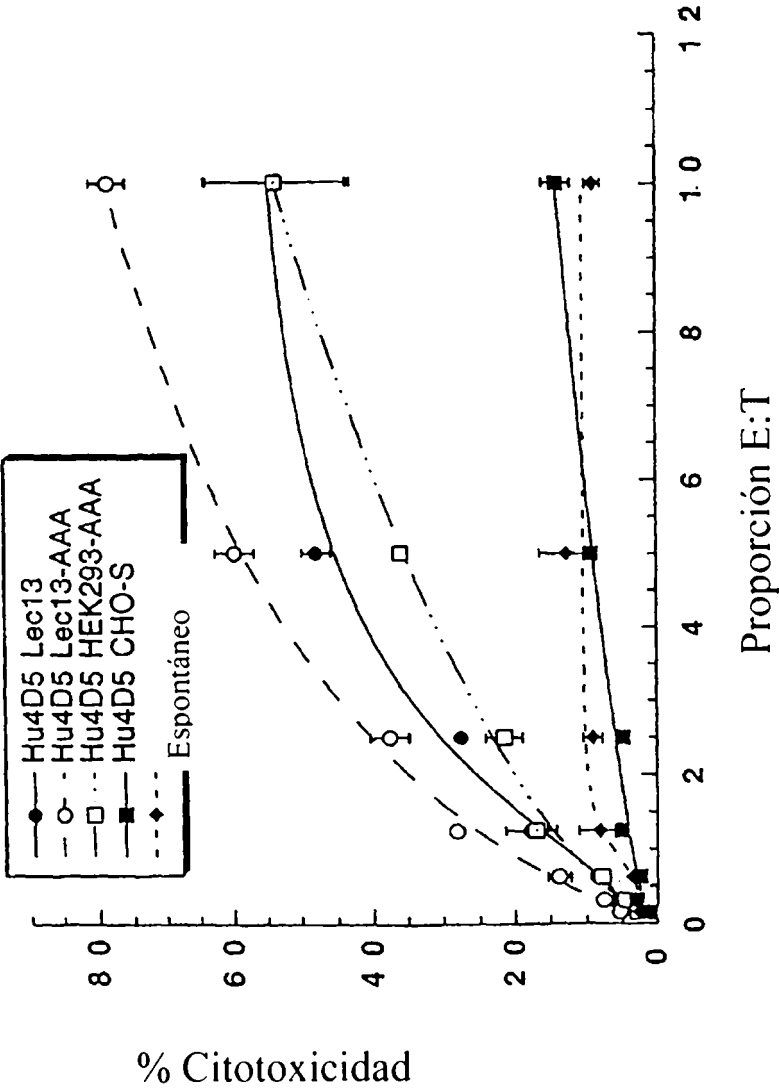


FIG. 26

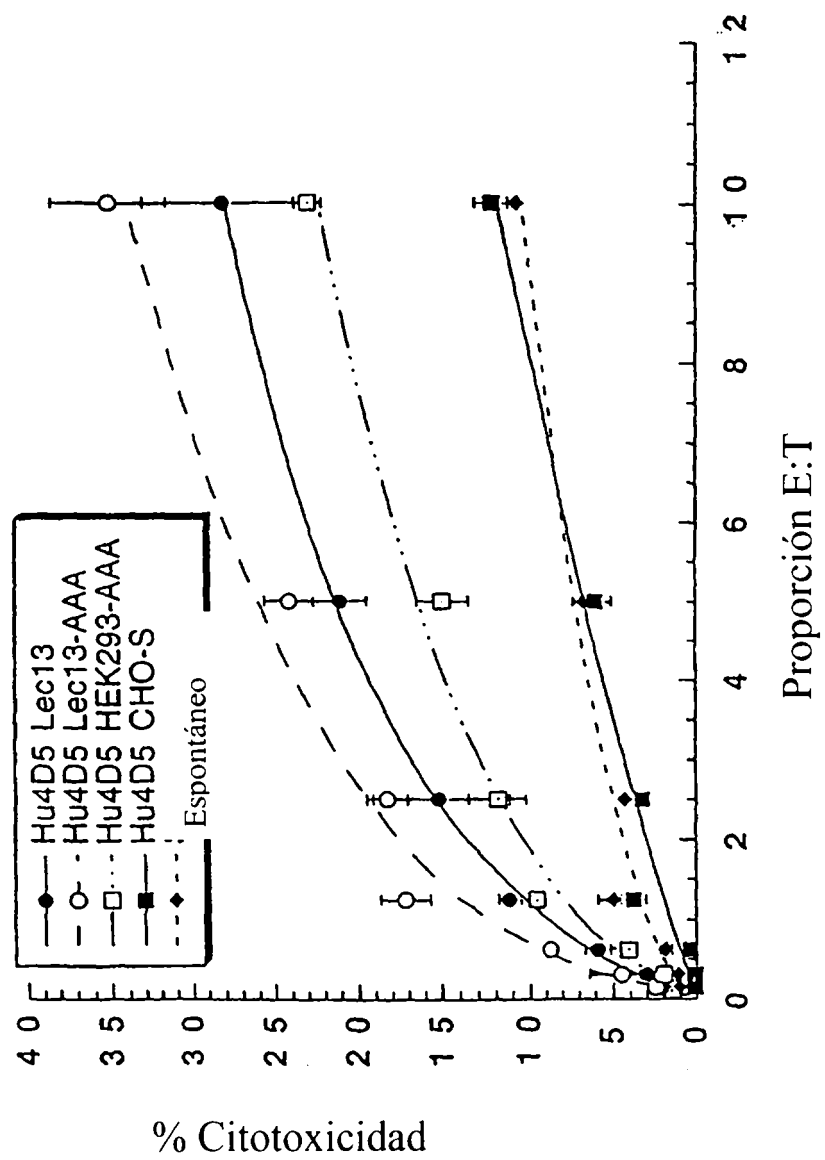


FIG. 27

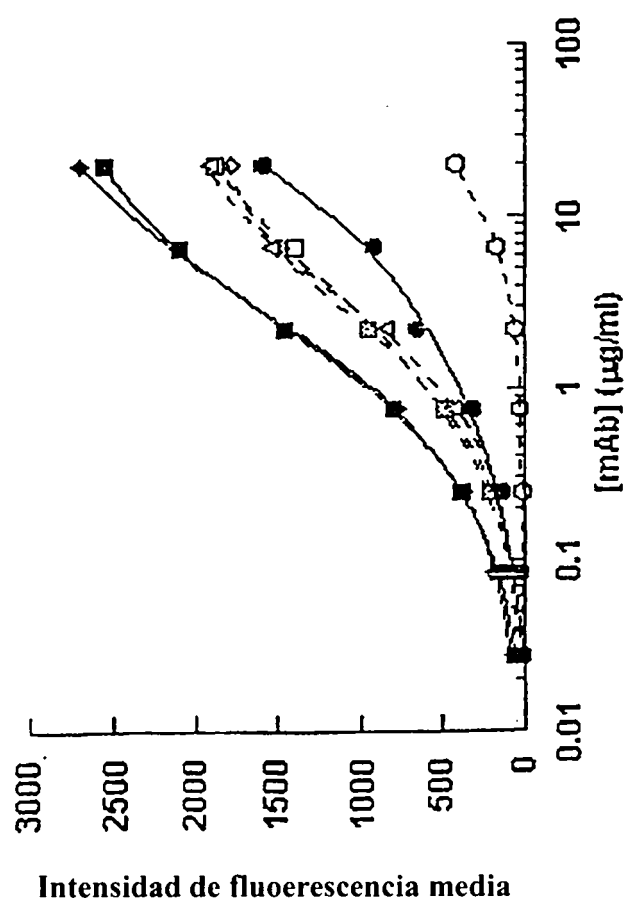


FIG. 28