



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332457

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

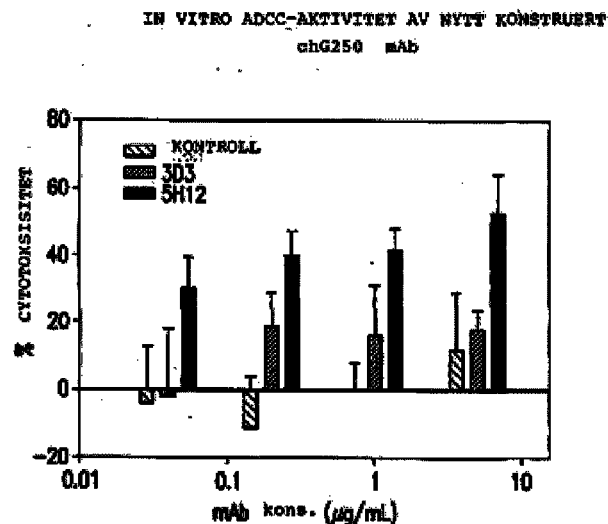
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040453	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.05 PCT/US2002/24739
(22)	Inng.dag	2004.02.02	(85)	Videreføringsdag	2004.02.02
(24)	Løpedag	2002.08.05	(30)	Prioritet	2001.08.03, US, 309516
(41)	Alm.tilgj	2004.03.30			
(45)	Meddelt	2012.09.24			
(73)	Innehaver	Glycart Biotechnology AG, c/o ETH Zürich, Institut für Biotechnologie, Einsteinstrasse, CH-8093 ZÜRICH, Sveits			
(72)	Oppfinner	James E Bailey, CH- ZÜRICH, Sveits Joel Jean-Mairet, Scheuchzerstrasse 94, CH-8006 ZURICH, Sveits Pablo Umaña, Käferholzstrasse #262, CH-8046 ZURICH, Sveits			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Glykomodifisert antistoff for anvendelse i behandling			
(56)	Anførte publikasjoner	Umana P. ET AL. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibodydependent cellular cytotoxic activity. Research, 1999, Vol.17, side 176-180. WO 9954342 A1 WO 9730087 A1 Davies J. et al. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FcγRIII. Biotechnol. Bioeng. 2001, Vol. 74, side 288-294. Surfus J.E. et al. Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors. Journal of Immunotherapy, 1996, Vol. 19, No. 3, side 184-191. Dürnbach A. et al. Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro. Cancer Gene Therapy, 1999, Vol. 6, No. 6, side 564-571. Umana P. ET AL. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibodydependent cellular cytotoxic activity. Research, 1999, Vol.17, side 176-180. WO 9954342 A1, WO 9730087 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår fagområdet glykosylering av proteiner. Mer bestemt angår foreliggende oppfinnelse glykosyleringsteknologi for generering av proteiner med forbedrede terapeutiske egenskaper, inkludert antistoffer med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxissitet.



OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Oppfinnelsens fagområde

Foreliggende oppfinnelse angår fagområdet glykosyleringsteknologi av proteiner. Mer
 5 bestemt angår foreliggende oppfinnelse anvendelse av glykosylering for å generere proteiner med forbedrede terapeutiske egenskaper, inkludert antistoffer med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet.

Teknikkens stilling

10 Glykoproteiner medierer mange essensielle funksjoner i mennesker, andre eukaryote organismer og noen prokaryoter, inkludert katalyse, signalisering, cellekommunikasjon og molekylgjenkjenning og assosiering. De utgjør majoriteten av ikke-cytosol proteinene i eukaryote organismer. (Lis et al., Eur. J. Biochem. 218: 1-27 (1993)). Mange glykoproteiner har vært utnyttet til terapeutisk formål og i løpet av de siste to
 15 tiårene har rekombinante versjoner av naturlig forekommende, utskilte glykoproteiner vært et stort produkt i bioteknologi industrien. Eksempler omfatter erythropoietin (EPO), terapeutiske monoklonale antistoffer (terapeutiske mAb), vevsplasminogenaktivator (tPA), interferon- β (IFN- β), granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) og human korionisk gonadotrofin (hCG). (Cumming et al., Glycobiology 1: 115-130
 20 (1991)).

Oligosakkaridkomponenten kan signifikant påvirke egenskaper som er relevant for virkningen av et terapeutiske glykoprotein, inkludert fysisk stabilitet, resistens mot protease-angrep, interaksjoner med immunforsvaret, farmakokinetikk og spesifikk
 25 biologisk aktivitet. Slike egenskaper kan ikke bare avhenge av tilstedeværelsen eller fraværet av, men også av oligosakkaridenes spesifikke struktur. Det kan gjøres noen generaliseringer mellom oligosakkaridstruktur og glykoproteinfunksjon. For eksempel medierer visse oligosakkaridstrukturer hurtig utskillelse av glykoproteinet fra blodstrømmen gjennom interaksjoner med spesifikke karbohydratbindende proteiner,
 30 mens andre kan bindes til antistoffer og trigge uønskede immunreaksjoner. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996)).

Mammalske celler er de foretrukne vertene til fremstilling av terapeutiske glykoproteiner på grunn av deres evne til å glykosylere proteiner til den mest
 35 compatible formen for anvendelse i mennesker. (Cumming et al., Glycobiology 1: 115-30 (1991), Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996)). Bakterier glykosylerer svært sjelden proteiner, og resulterer i, slik som andre vanlige typer verter som gjær,

filamentøse sopper, insekter og planteceller, i glykosyleringsmønstre som er assosiert med hurtig utskilling fra blodstrømmen, uønskede immuninteraksjoner, og i noen spesifikke tilfeller, redusert biologisk aktivitet. Blant mammalske celler har ovarieceller fra kinesisk hamster ("Chinese hamster ovary, (CHO)) vært mest brukt de siste to

5 tiårene. I tillegg til å gi hensiktsmessige glykosyleringsmønstre, tillater disse cellene konsekvent generering av genetisk stabile, svært produktive kloncellelinjer. De kan dyrkes i kultur til høye tettheter i enkle bioreaktorer ved anvendelse av serumfrie medier, og tillater utviklingen av sikre og reproducerbare bioprosesser. Andre vanlig brukte dyreceller omfatter nyreceller fra babyhamster ("baby hamster kidney", (BHK))

10 NS0- og SP2/0-myelomceller fra mus. I det siste har produksjon fra transgene dyr også blitt testet. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996)).

Alle antistoffer inneholder karbohydratstrukturer i konserverte posisjoner i de konstante områdene i den tunge kjeden, hvor hver isotype har en distinkt rekke av N-bundede

15 karbohydratstrukturer som varierende påvirker proteinmontering ("protein assembly"), utskillelse eller funksjonell aktivitet. (Wright, A og Morrison, S. L., Trends Biotech. 15: 26-32 (1997)). Strukturen til det festede N-bundede karbohydratet varierer betydelig avhengig av prosesseringsgraden, og kan omfatte høy-mannose, multippelt-forgrenet så vel som biantennekompleks oligosakkarider. (Wright, A. og Morrison, S. L. Trends

20 Biotech. 15: 26-32 (1997)). Typisk er det heterogen prosessering av kjerne-oligosakkaridstrukturene som er bundet i et bestemt glykosyleringspunkt, slik at til og med monoklonale antistoffer eksisterer som multiple glykoformer. Tilsvarende er det vist at det oppstår store forskjeller i antistoff-glykosylering mellom cellelinjer, og til og med mindre forskjeller ses i en gitt cellelinje som er dyrket under forskjellige

25 kulturbetingelser. (Lifely, M. R. et al., Glycobiology 5(8): 813-22 (1995)).

Ukonjugerte monoklonale antistoffer (mAb) kan være effektive medisiner til behandling av kreft, slik som vist med US Nærings og Legemiddelforvaltnings godkjenning av Rituximab (RituxanTM, IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA og Genentech Inc., San

30 Fransisco, CA) til behandling av CD20 positiv B-celle, lav-utviklingsstadium- eller follikulær non-Hodgkin lymfom, samt Trastuzumab (HerceptinTM, Genentech Inc.) til behandling av fremskreden brystkreft (Grillo-Lopez, A-J., et al., Semin. Oncol. 26: 66-73 (1999), Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21: 309-18 (1999)). Suksessen til disse produktene er ikke bare avhengig av virkningen deres, men også av deres enestående

35 sikkerhetsprofiler (Grillo-Lopez, A-J., et al., Semin. Oncol. 26:66-73 (1999), Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21: 309-18 (1999)). Til tross for hva man har oppnådd

med disse to legemidlene, er det for tiden stor interesse for å fremstille høyere spesifikk antistoffaktivitet enn hva ukonjugert mAb terapi gir.

En måte å oppnå store økninger i styrke, mens man opprettholder en enkel
 5 produksjonsprosess og potensielt unngår signifikante, uønskede bivirkninger, er å forsterke de naturlige, cellemedierte effektorfunksjonene til mAbene ved å konstruere ("engineering") deres oligosakkaridkomponent (Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17: 176-180 (1999)). IgG1 type antistoffer, de mest vanlig anvendte antistoffene i kreftimmunoterapi, er glykoproteiner med et konserverte N-bundet glykosyleringssete i
 10 Asn297 i hvert CH2-domene. De to komplekse biantenne-oligosakkaridene som er bundet til Asn297, er begravd mellom CH2-domenene, og danner utstrakt kontakt med polypeptidskjelettet, og deres tilstedeværelse er vesentlig for at antistoffet skal mediere effektorfunksjoner slik som antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) (Lifely, M. R., et al., Glycobiology 5: 813-822 (1995), Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163: 59-76 (1998), Wright, A. og Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15: 26-32 (1997)).

Foreliggende oppfinnere har tidligere vist at overekspressjon av p(1,4) N-acetylglukosaminyltransferase III (GnTIII), en glykosyltransferase som katalyserer dannelsen av todelte ("bisected") oligosakkarider, i eggstokkceller fra kinesisk hamster (CHO),
 20 signifikant øker *in vitro* ADCC-aktiviteten til et anti-neuroblastom kimært monoklonalt antistoff (chCE7) som produseres av de konstruerte CHO cellene. (Se Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17: 176-180 (1999), International Publikasjon nr. WO 99/54342. Antistoffet chCE7 tilhører en stor klasse ukonjugerte mAb som har høy tumoraffinitet og spesifisitet, men som har for liten styrke til å være klinisk effektiv når det produseres
 25 av standard industri-cellelinjer som mangler GnTIII enzymet (Umaña, P., et al., Nature Biotechnol 17: 176-180 (1999)). Det studiet var det første til å vise at det kan oppnås store økninger i maksimal *in vitro* ADCC-aktivitet ved å øke delen av (Fc)-assosierte, todelte oligosakkarider i det konstant område over nivåene som finnes i naturlig forekommende antistoffer. For å bestemme hvorvidt dette funnet kan ekstrapoleres til et
 30 ukonjugert mAb som allerede har signifikant ADCC-aktivitet i fravær av todelte oligosakkarider, har foreliggende oppfinnere anvendt denne teknologien på Rituximab, anti-CD20, IDEC-C2B8 kimære antistoffet. Foreliggende oppfinnere har på samme måte anvendt teknologien på det ukonjugerte anti-kreft mAb chG250.

KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av et glykomodifisert antistoff for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å behandle:

- 5 i) cancer,
 - ii) autoimmune trombocytopeni i kronisk "graft-versus-host" sykdom; eller
 - iii) immunformidlet, ervervet ekte rødcelle aplasi,
- hvor antistoffet spesifikt binder til humant CD20 antigen, hvor antistoffet har en minsket del av ikke-halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdi på 1648
- 10 Dalton og en økt del av enten halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1689, 1705, 1851 og 1867 Dalton eller halverte hybrid og galaktosylert kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1664, 1810 og 1826 Dalton relativ til et korresponderende ikke-glykomodifisert anti CD20 antistoff.
- 15 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse glykomodifisert antistoff for anvendelse i behandling av:
- i) cancer,
 - ii) autoimmune trombocytopeni i kronisk "graft-versus-host" sykdom eller
 - iii) immunformidlet, ervervet ekte rødcelle aplasi,
- 20 hvor antistoffet spesifikt binder til humant CD20 antigen, hvor antistoffet har en minsket del av ikke-halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdi på 1648 Dalton og en økt del av enten halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1689, 1705, 1851 og 1867 Dalton eller halverte hybrid og galaktosylert kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1664, 1810 og 1826 Dalton relativ
- 25 til et korresponderende ikke-glykomodifisert anti CD20 antistoff.

Foreliggende oppfinnere har nå generert nye glykosyleringsvarianter av det anti-CD20 monoklonale antistoffet (mAb) IDEC-C2B8 (Rituximab) og anti-kreft mAb chG250 ved anvendelse av genteknologisk fremstilte mAb-produserende cellelinjer som

30 overekspresserer N-acetylglukosaminyltransferase III (GnTIII, EC 2.1.4.144) på en tetrasyklin regulert måte. GnTIII er nødvendig for syntese av todelte oligosakkarider som finnes i lave til middels nivåer i naturlig forekommende humane antistoffer, men mangler i mAb som produseres i standard industri-cellelinjer. De nye glykosylerte versjonene utkonkurrerte MabtheraTM (versjonen av Rixtuximab som markedsføres i

35 Europa) og muse-myeloma avledet chG250 i biologisk (ADCC)-aktivitet. For eksempel krevdes det en 10-ganger lavere mengde av varianten som bærer de høyeste nivåene av todelte oligosakkarider for å nå den maksimale ADCC-aktiviteten til MabtheraTM. For

chG250, medierte varianten som bærer de høyeste nivåene av todelte oligosakkarider signifikant ADCC-aktivitet ved en 125-ganger lavere konsentrasjon enn hva som er nødvendig for å detektere selv lav ADCC-aktivitet med den umodifiserte kontrollen ch250. Det ble funnet en tydelig korrelasjon mellom nivået av GnTIII-ekspresjon og
 5 ADCC-aktivitet.

En utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er anvendelse hvor antistoffet er et kimært anti-humant CD20 monoklonalt antistoff.

10 En ytterligere utførelsesform er anvendelse der antistoffet er et antistoff-fragment som omfatter et spesifikt bindingssete.

Også anvendelse der antistoffet er et fusjonsprotein som omfatter Fc regionen til et immunoglobulin er en utførelsesform i følge foreliggende oppfinnelse.

15

Videre er følgende anvendelser utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse:

Anvendelse der mer enn 50% av oligosakkaridene i Fc regionen til antistoffet er halvert.

Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-5, der mer enn 70% av oligosakkaride i Fc regionen til antistoffet er halvert.

20 Anvendelse der canceren er B celle lymfom.

Anvendelse der nevnte antistoff har minst to ganger ADCC aktiviteten til det korresponderende antistoffet som ikke har blitt glykomodifisert.

Anvendelse der nevnte antistoff har minst tre ganger ADCC aktiviteten til det korresponderende antistoffet som ikke har blitt glykomodifisert.

25 Anvendelse der den farmasøytiske sammensetningen eller antistoff er til administrering i ukentlig 375 mg/m² infusjon i en periode på omtrent fire uker og;

Anvendelse der den farmasøytiske sammensetningen eller antistoff er til intravenøs administrering i to doser på omtrent 375 mg/m² ukentlig.

30 Det er også mulig å konstruere en vertscelle for å fremstille et polypeptid med økt Fc-mediert cellulær cytotoxicitet ved ekspresjon av minst en nukleinsyre som koder for $\beta(1,4)$ -N-acetylglukosaminyltransferase III(GnTIII), hvori polypeptidet som produseres av vertscellen selekteres fra gruppen som består av et helt antistoffmolekyl, et antistoff-fragment og et fusjonsprotein som omfatter et området som er ekvivalent med Fc-
 35 området i et immunoglobulin, og hvori GnTIII ekspresseres i en mengde som er tilstrekkelig til å øke andelen av nevnte polypeptid som bærer todelte hybrid-oligosakkarider eller galaktosylerte kompleks oligosakkarider eller blandinger derav i

Fc-området i forhold til polypeptidene som bærer todelte kompleks oligosakkarider i Fc-området.

Polypeptidet kan være IgG eller et fragment derav, eller IgG1 eller et fragment derav.

- 5 Polypeptidet kan også være et fusjonsprotein som omfatter et område som er ekvivalent til Fc-området i et humant IgG.

- Et nukleinsyremolekyl som omfatter minst et gen som koder for GnTIII, kan innføres i vertscellen. Videre er det mulig å innføre minst et gen som koder for GnTIII i
10 vertscellens kromosom.

- Alternativt har vertscellen blitt konstruert slik at et endogent GnTIII-gen aktiveres, for eksempel ved å sette inn et DNA-element i vertskromosomet som øker
genekspresjonen. det endogene GnTIII kan aktiveres ved å sette inn en promoter, en
15 enhancer, et bindingssete for transkripsjonsfaktor, et transposon eller et retroviralt element eller kombinasjoner derav i vertscellens kromosom. Videre er det mulig å selekttere vertscellen for å bære en mutasjon som trigger ekspresjon av et endogent GnTIII. Vertscellen kan da være CHO cellemutanten lec 10.

- 20 , Minst den ene nukleinsyren som koder for et GnTIII kan være operabelt bundet til et konstitutivt promoterelement.

- Vertscellen kan være en CHO-celle, en BHK-celle, en NS0-celle, en SP2/0-celle eller en hybridomcelle, en Y0-mylomcelle, en P3X63- myelomcelle fra mus, en PER-celle
25 eller en PER.C6-celle og nevnte polypeptid er et anti-CD20 antistoff. Vertscellen kan også være en SP2/0-celle og polypeptidet er det monoklonale antistoffet chG250.

- En vertscelle kan også ytterligere omfatte minst én transfektert nukleinsyre som koder for et antistoffmolekyl, et antistoff-fragment eller et fusjonsprotein som omfatter et
30 område som er ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin. Vertscellen kan videre omfatte minst én transfektert nukleinsyre som koder for et anti-CD20 antistoff, det kimære anti-humane neuroblastom monoklonale antistoffet chCE7, det kimære anti-humane nyrecelle karsinom monoklonale antistoffet chG250, det kimære anti-humane tarm, lunge og bryst karsinom monoklonale antistoffet ING-1, det humaniserte anti-
35 humane17-1A antigen monoklonale antistoffet 3622W94, det humaniserte anti-humane kolorektale tumorantistoffet A33, anti-humant melanom antistoff rettet mot GD3 gangliosid R24 eller det kimære anti-humane skvamøs ("squamous")-celle karsinom

monoklonale antistoffet SF-25, et anti-humant EGFR antistoff, et anti-humant EGFRvIII antistoff, et anti-humantPSMA antistoff og et anti-humant PSCA antistoff, et anti-humant CD22 antistoff, et anti-humant CD30 antistoff, et anti-humant CD33 antistoff, et anti-humant CD38 antistoff, et anti-humant CD40 antistoff, et anti-humant CD45 antistoff, et anti-humant CD52 antistoff, et anti-humant CD138 antistoff, et anti-humant HLA-DR variant antistoff, et anti-humant EpCAM antistoff, et anti-humant CEA antistoff, et anti-humant MUC1 antistoff, et anti-humant MUC1 kjerneprotein antistoff, et anti-humant aberrasjon glykosylert MUC1 antistoff, et antistoff mot humane fibronektinvarianter som inneholder ED-B domenet og et anti-humant HER2/neu antistoff.

En fremgangsmåte for å fremstille et polypeptid i en vertscelle som omfatter å dyrke de ovenfor nevnte vertscellene under betingelser som tillater produksjonen av nevnte polypeptid med økt Fc-mediert cellulær cytotoxicitet er mulig å utføre.

Fremgangsmåten kan ytterligere omfatte isolering av nevnte polypeptid med økt Fc-mediert cellulær cytotoxicitet.

Vertscellen kan videre omfatte minst en nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som omfatter et område som er ekvivalent med et glykosylert Fc-område i et immunoglobulin.

Andelen av todelte oligosakkarider i Fc-området er i nevnte polypeptider større enn 50 %, de kan også være større enn 70%.

Andelen kan også være todelte hybrid-oligosakkarider eller galaktosylerte kompleks-oligosakkarider eller blandinger derav i Fc-området større enn andelen av todelte kompleks-oligosakkarider i Fc-området i nevnte polypeptid.

I nevnte fremgangsmåte er polypeptidet et anti-CD20 antistoff og anti-CD20 antistoffene som produseres av nevnte vertscelle har en glykosyleringsprofil, som analysert på MALDI/TOF-MS, som er vesentlig ekvivalent med den som er vist i fig. 2E.

I fremgangsmåten kan også polypeptidet det chG250 monoklonale antistoffet benyttes , chG250 antistoffene som produseres av nevnte vertscelle har en glykosyleringsprofil, som analysert på MALDI/TOF-MS, som er vesentlig ekvivalent med den som er vist i fig. 7D.

Antistoffet med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxissitet (ADCC) kan fremstilles ved hvilken som helst av de ovenfor beskrevne fremgangsmåtene. Antistoffer som selekteres fra gruppen kan bestå av et anti-CD20 antistoff, chCE7, ch-G250, et

5 humanisert anti-HER2 monoklonalt antistoff, ING-1, 3622W94, SF-25, A33 og R24. Alternativt kan polypeptidet være et antistoff-fragment som omfatter et område som er ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin, som har økt Fc-mediert cellulær cytotoxissitet og er fremstilt ved hvilken som helst av de ovenfor beskrevne fremgangsmåtene.

10

Det er også mulig å fremstille et fusjonsprotein som omfatter et område som er ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin og som har økt Fc-mediert cellulær cytotoxissitet og er fremstilt ved hvilken som helst av de ovenfor beskrevne fremgangsmåtene.

15

I et aspekt er den foreliggende oppfinnelsen rettet mot anvendelsen av et farmasøytisk preparat, som omfatter antistoffet, antistoff-fragmentet, eller fusjonsproteinet også en farmasøytisk akseptabel bærer kan inngå.

20

I et ytterligere aspekt er den krevde oppfinnelsen rettet mot en anvendelse til behandling av kreft som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av nevnte farmasøytiske preparat til en pasient som har behov for det.

25

I et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en anvendelse til å behandle en autoimmun sykdom helt eller delvis produseres av patogene autoantistoffer basert på B-celle deplering som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av et immunologisk aktivt antistoff til et menneske som har behov for det, hvor forbedringen omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff med økt ADCC som er fremstilt slik som beskrevet over. I en foretrukket utførelsesform er antistoffet et

30 anti-CD20 antistoff.

35

Eksempler på autoimmune sykdommer eller forstyrrelser kan være immunmediert trombocytopeni, slik som akutt idiopatisk trombocytopenisk purpura og kronisk idiopatisk trombocytopenisk purpura, dermatomyositt, Sydenhams chorea, lupus nefritt, revmatisk feber, polyglandulære syndromer, Henoch-Schönleins purpura, post-streptococcal nefritt, erythema nodosum, Takayasu arteritt, Addisons sykdom, erythema multiforme, polyarteritt nodosa, ankyloserende spondylitt, Goodpastures

syndrom, tromboangitt ubiterans, primær biliær cirrhose, Hashimotos thyroiditt, tyrotoksikose, kronisk aktiv hepatitt, polymyositt/dermatomyositt, polykondritt, pamfigus vulgaris, Wegeners granulomatose, membranøs nefropati, amyotrofisk lateralsklerose, tabes dorsalis, polymyagli, pernisiøs anemi, hurtig progressiv

5 glomerulonefritt og fibroserende alveolitt, inflammatoriske responser som inflammatoriske hudsykdommer inkludert psoriasis og dermatitt (f. eks. atopisk dermatitt), systemisk skleroderma og sklerose, responser som er assosiert med inflammatorisk tarmsykdom (som Crohns sykdom og ulcerative kolitt), åndenødssyndromet (inkludert åndenødssyndrom hos voksne, ARDS), dermatitt,

10 meningitt, encefalitt, uveitt, colitt, glomerulonefritt, allergiske tilstander som eksem og astma og andre tilstander som er involvert i infiltrering av T-celler og kronisk inflammatoriske responser, aterosklerose, leukocyt adhesionssvikt, revmatisk artritt, systemisk lupus erythematosus (SLE), diabetes mellitus (f. eks. Type1 diabetes mellitus eller insulin-avhengig diabetes mellitus), multippel sklerose, Reynauds syndrom,

15 autoimmun tyroiditt, allergisk encefalomyelitt, Sjørgens syndrom, diabetes som begynner i ungdom/barndom og immunresponser som er assosiert med akutt og forsinket hypersensitivitet mediert av cytokiner og T-lymfocytter som typisk finnes i tuberkulose, sarkoidose, polymyositt, granulomatose og vaskulitt, pernisiøs anemi (Addisons sykdom), sykdommer som omfatter leukocyt diapedese, inflammatoriske

20 forstyrrelser i sentralnervesystemet (CNS), multippelt organskadende syndrom, hemolytisk anemi (inkludert, men ikke begrenset til kryogloblinemi eller Coombs positiv anemi), myasthenia gravis, antigen-antistoff kompleks medierte sykdommer, anti-glomerulær basalmembran sykdom, antifosfolipidsyndrom, allergisk neuritt, Graves sykdom, Lambert-Eaton myastenisk syndrom, pemfigoid bulløs, pemfigøs, autoimmun

25 polyendokrinopati, Reiters sykdom, stiff-man syndrom, Behcet sykdom, kjempecelle arteritt, immunkompleks nefritt, IgA nefropati, IgM polyneuropatier, immun trombocytopenisk purpura (ITP) eller autoimmun trombocytopeni etc. I dette aspektet av oppfinnelsen anvendes antistoffene ifølge oppfinnelsen for å deplere blodet i normale B-celler i en utstrakt periode.

30

BESKRIVELSE AV FIGURENE

Fig. 1 Indirekte immunofluorescensanalyse som viser reaktiviteten til antistoffpreparatet C2B8-25t på CD20-positive SB-celler. Negative kontroller, inkludert den HSB CD20-negative cellelinjen og celler som kun er behandlet med det sekundære FITC-konjugerte

35 anti-humane Fc polyklonale antistoffet, er ikke vist.

Fig. 2A-2E. MALDI/TOF-MS spektra av oligosakkaridene som er avledet fra MabtheraTM (fig. 2A), C2B8-nt (fig. 2B), C2B8-2000t (fig. 2C), C2B8-50t (fig. 2D) og

C2B8-25t (fig. 2E) antistoffprøver. Oligosakkarider fremkommer som $[M+Na^+]$ og $[M+K^+]$ ioner. Oligosakkarid som fremkommer i de første to spektra ble avledet fra cellekulturer som ikke ekspresserer GnTIII, mens oligosakkarider i C, D og E ble avledet fra en enkeltcellelinje som ekspresserer GnTIII i forskjellige nivåer (dvs. tetrasyklinkonsentrasjoner).

Fig. 3A og 3B. Illustrasjon av en typisk human IgG Fc-assosiert oligosakkaridstruktur (A) og partiell N-bundet glykosyleringsreaksjonsvei (B). (Fig. 3A) Kjernen i oligosakkaridet består av tre mannose (M) og to N-acetylglucosamin (Gn) monosakkarid-residier bundet til Asn₂₉₇. Galaktose (G), fukose (F) og todelt N-acetylglucosamin (Gn, innrammet) kan være tilstede eller fraværende. Terminal N-acetylneuraminsyre kan også være tilstede, men er ikke inkludert i figuren. (Fig. 3B) Partiell N-bundet glykosyleringsreaksjonsvei som fører til dannelsen av hovedoligosakkarid-klassene (stiplede rammer). Todelt N-acetylglucosamin betegnes Gn^b. Tall med senket skrift indikerer hvor mange monosakkarid-residier som er tilstede i hvert oligosakkarid. Hver struktur fremkommer sammen med sin natrium-assosierte $[M+Na^+]$ masse. Massen til disse strukturene som inneholder fukose (f) er også inkludert.

Fig. 4A og 4B. ADCC-aktivitetene til Rituximab glykosyleringsvarianter. Prosentandelen av cytotoksitet ble målt via lysing av ⁵¹Cr-merkede CD20-positive SB-celler av humane lymfocytter (E:T forhold på 100:1) mediert av forskjellige mAb konsentrasjoner. (Fig. 4A) Aktiviteten til C2B8 prøver som er avledet fra en enkeltcellelinje, men er produsert ved økende GnTIII ekspresjonsnivåer (dvs. avtagende tetrasyklin-konsentrasjoner). Prøvene er C2B8-2000t, C2B8-50t, C2B8-25t og C2B8-nt (kontroll mAb avledet fra en klon som ikke ekspresserer GnTIII). (Fig. 4B) ADCC-aktiviteten til C2B8-50t og C2B8-25t sammenlignet med MabtheraTM.

Fig. 5. Western blot analyse av de 7 GnTIII ekspresserende klonene og villtypen. 30 µg av hver prøve ble satt på en 8.75% SDS gel, overført til en PVDF-membran og probet med anti-c-myc monoklonalt antistoff (9E10). WT refererer til wt-chG250-SP2/0-celler.

Fig. 6. SDS polyakrylamid gelelektroforese av oppløste rensede antistoffprøver.

Fig. 7A-7D. MALDI/TOF-MS spektra av nøytrale oligosakkaridblandinger fra chG250 mAb prøver som er produsert av kloner som ekspresserer forskjellige nivåer av GnTIII og wt-chG250-SP2/0-celler: WT (fig. 7A), 2F1 (fig. 7B), 3D3 (fig. 7C), 4E6 (fig. 7D).

Fig. 8A-8D. MALDI/TOF-MS spektra av nøytrale oligosakkaridblandinger fra chG250 mAb prøver som produseres av kloner som ekspresserer forskjellige nivåer av GANTE: 4E8 (fig. 8A), 5G2 (fig. 8B), 4G3 (fig. 8C), 5H12 (fig. 8D).

Fig. 9. *In vitro* ADCC-analyse av antistoff-prøver som er avledet fra kontroll wt-chG250-SP2/-celler og GnTIII transekterte kloner 3D3 og 5H12.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Betegnelsene som anvendes heri er slik som stort sett anvendes innen fagområdet dersom annet ikke er angitt, som følger:

5

Betegnelsen "antistoff" slik den anvendes heri, er ment å omfatte hele antistoffmolekyler, antistoff-fragmenter eller fusjonsproteiner som omfatter et område som er ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin.

- 10 Betegnelsen "område som er ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin" slik den anvendes heri, er ment å omfatte naturlig forekommende allel-varianter av Fc-området i et immunoglobulin så vel som varianter med endringer som produserer substitusjoner, addisjoner eller delesjoner, men som ikke vesentlig senker immunoglobulinets evne til å mediere antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet. For eksempel kan en eller flere
- 15 aminosyrer deleteres fra N-terminalen eller C-terminalen i Fc-området i et immunoglobulin uten vesentlig tap av biologisk funksjon. Slike varianter kan selekteres i overensstemmelse med generelle regler som er kjent innen fagområdet, slik som å ha minimal effekt på aktivitet. (Se, f. eks Bowie, J. U. et al., Science 247: 1306-10 (1990).
- 20 Betegnelsen "glykoprotein-modifiserende glykosyltransferase" slik den anvendes heri, refererer til $\beta(1,4)$ -N-acetylglukosaminyltransferase III(GnTIII).

- Betegnelsen "konstruere, konstruert, konstruering og glykosyleringsteknologi ("glycosylation engineering")" slik den anvendes heri, er ment å omfatte enhver
- 25 manipulering av glykosyleringsmønsteret i et naturlig forekommende polypeptid eller fragment derav. Glykosyleringsteknologi omfatter metabolsk konstruksjon av glykosyleringsmaskineriet i en celle, inkludert genetiske modifiseringer av oligosakkaridsyntesereaksjonsveiene for å oppnå forandret glykosylering av glykoproteinene som ekspresseres i celler. Dessuten omfatter glykosyleringsteknologi
- 30 effektene av mutasjoner og cellemiljø på glykosylering.

- Betegnelsen "vertscelle" dekker ethvert cellulært system som kan konstrueres for å generere modifiserte glykoformer av proteiner, protein-fragmenter eller peptider av interesse, inkludert antistoffer og antistoff-fragmenter. Typisk har vertscellen blitt
- 35 modifisert for å eksprimere optimaliserte nivåer av GnTIII. Vertscellene omfatter celler i kultur, f. eks. mammalske celler i kultur, slik som CHO-celler, BHK-celler, NSO-celler, SP2/0-celler, YO-mylomceller, P3X63-mylomceller fra mus, PER-celler,

PER.C6-celler eller hybridomceller, gjærceller og insektceller, for kun å nevne noen få, men også celler som finnes i et transgent dyr eller dyrket vev.

Betegnelsen "Fc-mediert cellulær cytotoxicitet" slik den anvendes heri, er ment å omfatte antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet og cellulær cytotoxicitet som medieres av et løselig Fc-fusjonsprotein som inneholder et humant Fc-område. Det er en immunmekanisme som fører til lyseringen av de "antistoff-målsøkte cellene" med "humane immuncellceller", hvori:

De "humane immuncellcellene" er en populasjon av leukocytter som uttrykker Fc-reseptorer på overflaten, hvorigjennom de binder til Fc-området i antistoffer eller i Fc-fusjonsproteiner, og utfører effektorfunksjonene. En slik populasjon kan omfatte, men er ikke begrenset til, mononukleære celler i perifert blod (PBMC) og/eller naturlige dreperceller ("natural killer", NK).

De "antistoff-målsøkte cellene" er celler som bindes av antistoffene eller Fc-fusjonsproteinene. Antistoffene eller Fc-fusjonsproteinene binder til målceller via proteindelen N-terminalt for Fc-området.

Betegnelsen "økt Fc-mediert cellulær cytotoxicitet" slik den anvendes heri, er definert enten som en økning i antall "antistoff-målsøkte celler" som lyseres iløpet av en gitt tid, i en gitt antistoff-konsentrasjon eller av Fc-fusjonsprotein i mediet som omgir målcellene med mekanismen for Fc-mediert cellulær cytotoxicitet som er definert over, og/eller reduksjon i antistoff-konsentrasjon eller av Fc-fusjonsprotein i mediumet som omgir målcellene som er nødvendig for å oppnå lysering av lysering av et gitt antall "antistoff-målsøkte celler", iløpet av en gitt tid, med mekanismen for Fc-mediert cellulær cytotoxicitet. Økningen i Fc-mediert cellulær cytotoxicitet er relativt til den cellulære cytotoxiciteten som medieres av det samme antistoffet eller Fc-fusjonsproteinet som er produsert av samme type vertsceller, ved anvendelse av samme standard produksjon, rensing, formulering og oppbevaringsmetoder som er kjent for en fagmann på området, men som ikke er produsert av vertscellene som er konstruert for å ekspressere glykosyltransferase GnTIII ved fremgangsmåtene som er beskrevet heri.

Med "antistoff som har økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC)" menes et antistoff med økt ADCC som bestemt ved enhver egnet fremgangsmåte som er kjent for en fagmann på området. En akseptert *in vitro* ADCC-analyse er som følger:

1) analysen anvender målceller som er kjent å ekspressere målantigenet som gjenkjennes av det antigenbindende området i antistoffet,

2) analysen anvender humane mononukleære celler fra perifert blod (PBMC),
5 som er isolert fra blod fra vilkårlig valgt frisk donor, som effektor celler,

3) analysen utføres i overensstemmelse med følgende protokoll:

- i) PBMCene isoleres ved anvendelse av standard tetthetssentrifugeringsprosedyrer og suspenderes med 5×10^6 celler/ml i RPMI cellekulturmedium,
- 10 ii) Mållcellene dyrkes ved standard vevsdyrkningsmetoder, høstes i den eksponensielle vekstfasen med en levedyktighet på høyere enn 90%, vaskes i RPMI-cellekulturmediumet, merkes med 100 mikro-Curie ^{51}Cr , vaskes to ganger med cellekulturmedium, og resuspenderes i cellekulturmedium med en tetthet på 10^5 celler/ml,
- 15 iii) 100 mikroliter av den endelige målcellesuspensjonen overføres til hver brønn på en 96-brønners mikrotiterplate,
- iv) Antistoffet serie-fortynnes fra 4000 ng/ml til 0.04 ng/ml i cellekulturmedium, og 50 mikroliter av de resulterende antistoffløsningene tilsettes til mållcellene på 96-brønners mikrotiterplaten, ulike antistoff-konsentrasjoner testes i triplikat og
- 20 dekker hele konsentrasjonsområdet over,
- v) For maksimal frigivnings ("maximum release", MR)-kontrollene, fikk ytterligere 3 brønner på platen som inneholdt de merkede cellene, 50 mikroliter av en 2% (V/V) vanndig løsning av ikke-ionisk detergent (Nonidet, Sigma, St. Louis), istedet for antistoffløsningen (punkt iv over),
- 25 vi) For spontan frigivnings (SR) kontroller, fikk ytterligere 3 brønner på platen som inneholdt de merkede cellene, 50 mikroliter av RPMI cellekulturmedium i stedet for antistoffløsningen (punkt iv over),
- vii) 96-brønners mikrotiterplaten sentrifugeres deretter ved $50 \times g$ i 1 minutt og inkuberes 1 time ved 4°C ,
- 30 viii) 50 mikroliter PBMC løsningen (punkt i over) settes til hver brønn for å gi et effektor:mållcelle forhold på 25:1, og platene plasseres i en inkubator under 5% CO_2 atmosfære ved 37°C for 4 timer,
- ix) Den cellefrie supernatanten fra hver brønn høstes og radioaktiviteten (ER) som frigis i forsøket, kvantifiseres ved anvendelse av en gamma-teller,
- 35 x) prosentdel spesifikk lyse beregnes for hver antistoff-konsentrasjon i samsvar med formelen $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, hvor ER er den gjennomsnittlige radioaktiviteten kvantifisert (se punkt ix over) for den aktuelle antistoff-

konsentrasjonen, MR er den gjennomsnittlige radioaktiviteten kvantifisert (se punkt ix over) for MR kontrollene (se punkt v over), og SR er gjennomsnittlig radioaktivitet kvantifisert (se punkt ix over) for SR kontrollene (se punkt vi over),

5

- 4) "økt ADCC" defineres enten som en økning i maksimal prosentdel spesifikk lyse som observeres innenfor antistoff-konsentrasjonsområdet som er testet over, og/eller en reduksjon i antistoff-konsentrasjon som kreves for å oppnå halvparten av maksimal prosent av spesifikk lyse som observeres innenfor antistoff-konsentrasjonsområdet som er testet over. Økningen i ADCC er relativt til ADCC som er målt i analysen over, mediert av det samme antistoffet som er produsert av samme type vertscelle, ved anvendelse av samme standard produksjon, rensing, formulering og oppbevaringsmetoder som er kjent for en fagmann på området, men som ikke er produsert av vertscellene som er konstruert for å overekspresere glykosyltransferasen GnTIII.

15

Betegnelsen anti-CD20 antistoff slik den anvendes heri, er ment å bety et antistoff som spesifikt gjenkjenner et celleoverflate ikke-glykosylert fosfoprotein på 35 000 Dalton, som typisk betegnes som det humane B-lymfocyt restriksjonsenzym-behandlede differensieringsantigenet Bp35 ("human B lymphocyte restricted differentiation antigen Bp35"), som vanligvis refereres til som CD20.

20

Identifisering og generering av nukleinsyrer som koder for et protein som det er ønskelig å modifisere glykosyleringsmønsteret til

25

Det beskrives i det følgende en fremgangsmåte til generering og anvendelse av vertscellesystemer til fremstillingen av glykoformer av antistoffene eller antistofffragmenter eller fusjonsproteiner som omfatter antistoff-fragmenter med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet. Identifisering av målepitoper og generering av antistoffer med potensiell terapeutisk verdi, som det er ønskelig å modifisere glykosyleringsmønsteret til, samt isolering av deres respektive kodende nukleinsyresekvenser. Forskjellige fremgangsmåter som er kjent inne fagområdet kan anvendes for produksjon av antistoffer for å målsøke epitoper av interesse. Slike antistoffer omfatter, men er ikke begrenset til polyklonale, monoklonale, kimære, enkeltkjadede, Fab-fragmenter og fragmenter som produseres av et Fab-ekspresjonsbibliotek. Slike antistoffer kan være nyttige som f. eks diagnostiske eller terapeutiske midler. Som terapeutiske midler er nøytraliserende antistoffer, dvs. de som

35

konkurrerer om binding med en ligand, substrat eller adaptermolekyl, av spesiell foretrukket interesse.

For fremstillingen av antistoffene immuniseres ulike vertsdyr ved injeksjon med
 5 målproteinet av interesse, inkludert, men ikke begrenset til kaniner, mus, rotter, etc. Forskjellige adjuvanser kan anvendes for å øke den immunologiske responsen, avhengig av vertsarten, inkludert, men ikke begrenset til Freund's (komplett og ikke-komplett), mineralgeler slik som aluminiumhydroksid, overflateaktive substanser slik som lysolecitin, pluroniske polyoler, polyanioner, peptider, saponin, olje-emulsjoner,
 10 hemocyanin fra igle ("keyhole limpet hemocyanin"), dinitrofenol og potensielt effektive humane adjuvanser slik som BCG (bacille Calmette-Guerin) og *Corynebacterium parvum*.

Monoklonale antistoffer mot målet av interesse kan fremstilles ved anvendelse av
 15 hvilken som helst teknikk som gir produksjon av antistoffmolekyler fra fortløpende cellinjer i kultur. Disse omfatter, men er ikke begrenset til hybridom-teknikken som opprinnelig er beskrevet av Kohler og Milstein, *Nature* 256: 495-97 (1975), den humane B-celle hybridom-teknikken (Kosbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983), Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2026-30 (1983) og EBV-hybridom-teknikken
 20 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77-96 (Alan R. Liss, Inc., 1985)). I tillegg kan teknikker som er utviklet for fremstilling av "kimære antistoffer" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851-55 (1984), Neuberger et al., *Nature* 312: 604-08 (1984), Takeda et al., *Nature* 314: 452-54 (1985) ved å spleise genene fra et antistoffmolekyl fra mus som har riktig antigenspesifisitet sammen med
 25 gener fra et humant antistoffmolekyl med riktig biologisk aktivitet, anvendes. Alternativt kan teknikker som er beskrevet for produksjon av enkeltkjedede antistoffer (US patent nr. 4,946,778) tilpasses til å produsere enkeltkjedede antistoffer med ønsket spesifisitet.

30 Antistoff-fragmenter som inneholder spesifikke bindingssteder fra målproteinet av interesse kan genereres med kjente teknikker. For eksempel omfatter slike fragmenter, men er ikke begrenset til, $F(ab')_2$ -fragmenter som kan fremstilles ved pepsin-fordøyning av antistoffmolekylet og Fab-fragmentene som kan genereres ved å redusere disulfidbroene i $F(ab')_2$ -fragmentene. Alternativt kan Fab-ekspresjonsbibliotekene konstrueres
 35 (Huse et al., *Science* 246: 1275-81 (1989) for å gi hurtig og enkel identifisering av monoklonale Fab-fragmenter med den ønskede spesifisiteten for å målsøke proteinet av interesse.

Så snart et antistoff eller antistoff-fragment er identifisert som det er ønskelig å modifisere glykosyleringsmønsteret til, identifiseres den kodende nukleinsyresekvensen og isoleres ved anvendelse av teknikker som er godt kjent innen fagområdet.

5

a. Generering av cellelinjer til produksjon av proteiner med endret glykosyleringsmønster

- Det er mulig og tilveibringe et vertscelle-ekspresjonssystem til generering av proteiner med modifiserte glykosyleringsmønstre. Mer bestemt kan det tilveiebringes
- 10 vertscellesystemer til generering av glykoformer av proteiner med forbedret terapeutisk verdi. Derfor tilveiebringer oppfinnelsen vertscelle-ekspresjonssystemer som er selektert eller konstruert for å øke ekspresjonen av en glykoprotein-modifiserende glykosyltransferase, nemlig p(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III(GnTIII). Spesifikt kan slike vertscelle-ekspresjonssystemer konstrueres til å omfatte et
- 15 rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for GnTIII, operativt bundet til et konstitutivt eller regulerbart promotersystem. Alternativt kan vertscelle-ekspresjonssystemer benyttes som naturlig produserer, er induisert til å produsere og/eller er selektert for å produsere GnTIII.
- 20 En vertscelle kan konstrueres for å eksprimere minst en nukleinsyre som koder for GnTIII. Vertscellen kan dermed transformeres eller transfekteres med et nukleinsyremolekyl som omfatter minst et gen som koder for GnTIII. I et alternativt aspekt er vertscellen konstruert og/eller selektert på en slik måte at endogen GnTIII aktiveres. For eksempel kan vertscellen selekteres for å bære en mutasjon som trigger
- 25 ekspresjon av endogent GnTIII. Vertscellen kan også være en CHO lec10 mutant. Alternativt kan vertscellen konstrueres slik at endogent GnTIII aktiveres. I enda et annet alternativ, konstrueres vertscellen slik at endogent GnTIII aktiveres ved innsetting av et konstitutivt promoterelement, et transposon eller et retroviralt element i vertscellekromosomet.
- 30 Stort sett kan alle typer cellelinjer i kultur anvendes som bakgrunn for konstruksjon av vertscellelinjene som nevnt over. Det er mulig å anvende CHO-celler, BHK-celler, NSO-celler, SP2/0-celler, YO-mylomceller, P3X63 muse myelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, gjærceller eller insektceller som utgangscellelinje
- 35 for å frembringe de konstruerte vertscellene .

En konstruert vertscelle som eksprimerer GnTIII slik som definert heri kan være:

En eller flere nukleinsyrer som koder for GnTIII kan ekspresseres under kontroll av en konstitutiv promoter eller, alternativt et regulerbart ekspresjonssystem. Hensiktsmessige regulerbare ekspresjonssystemer omfatter, men er ikke begrenset til et

5 tetrasyklinregulert ekspresjonssystem, et ecdyson-induserbart ekspresjonssystem, et lac-switch ekspresjonssystem, et glukokortikoid-induserbart ekspresjonssystem, et temperatur-induserbart promotersystem, og et metallotionein metallinduserbart ekspresjonssystem. Dersom flere forskjellige nukleinsyrer som koder for GnTIII finnes i vertscellesystemet, kan noen av dem ekspresseres under kontroll av en konstitutiv

10 promoter, mens andre ekspresseres under kontroll av en regulerbar promoter. Det maksimale ekspresjonsnivået anses for å være det høyest mulige nivået av stabil GnTIII-ekspresjon som ikke har en signifikant ugunstig effekt på celleveksthastighet og bestemmes ved anvendelse av rutinemessig eksperimentering. Ekspresjonsnivåene bestemmes ved hjelp av fremgangsmåter som stort sett er kjent innen fagområdet,

15 inkludert Western blot analyse ved anvendelse av et GnTIII spesifikt antistoff, Northern blot analyse ved anvendelse av en GnTIII spesifikk nukleinsyreprobe eller målinger av enzymatisk aktivitet. Alternativt kan et lectin som binder til de biosyntetiske produktene av GnTIII, for eksempel E₄-PHA lectin, benyttes. I et ytterligere alternativ kan nukleinsyren være operabelt bundet til et reporter-gen, ekspresjonsnivået til GnTIII

20 bestemmes ved å måle et signal som er korrelert med ekspresjonsnivået til reporter-genet. Reporter-genet kan transkriberes sammen med nukleinsyren(e) som koder for nevnte GnTIII som et enkelt mRNA molekyl eller deres respektive kodende sekvenser kan linkes sammen enten med et internt ribosom adgangssete ("internal ribosome entry site", IRES) eller med en cap-uavhengig translasjonsforsterker ("cap-independent translation enhancer", CITE). Reporter-genet kan translateres sammen med

25 minst en nukleinsyre som koder for nevnte GnTIII slik at det dannes en enkel polypeptidkjede. Nukleinsyren som koder for GnTIII kan være operabelt bundet til reporter-genet under kontroll av en enkelt promoter, slik at nukleinsyren som koder for GnTIII og reporter-genet transkriberes til et RNA molekyl som alternativt spleises til to

30 separate messenger RNA (mRNA) molekyler, hvor et av de resulterende mRNAene translateres til nevnte reporterprotein, og det andre translateres til nevnte GnTIII.

Dersom flere forskjellige nukleinsyrer som koder for et GnTIII ekspresseres, kan de arrangeres på en slik måte at de transkriberes som ett eller som flere mRNA molekyler.

35 Dersom de transkriberes som ett enkelt mRNA molekyl, kan deres respektive kodende sekvenser enten være bundet sammen med et indre ribosomadgangssete (IRES) eller med en cap-uavhengig translasjonsenhancer (CITE). De kan transkriberes fra en enkelt

promoter, til et RNA molekyl som alternativt spleises til flere separate messenger RNA (mRNA) molekyler, som deretter hver for seg translateres til sine respektivt kodede GnTIII.

- 5 Vertscelle-ekspresjonssystemer for å generere terapeutiske antistoffer med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoksisitet, og celler som uttrykker IgG Fc-området på overflaten for å fremme Fc-mediert cytotoksisitet er også mulig å fremstille. Stort sett har vertscelle-ekspresjonssystemene vært konstruert og/eller selektert for å eksprimere nukleinsyrer som koder for antistoffet som det er ønskelig å fremstille endrede
- 10 glykoformer av, sammen med minst en nukleinsyre som koder for GnTIII. I en utførelsesform transfekteres vertscellesystemet med minst et gen som koder for GnTIII. Typisk selekteres de transfekteerte cellene for å identifisere og isolere kloner som eksprimerer GnTIII stabilt. I en annen utførelsesform selekteres vertscellen mht. ekspresjon av endogen GnTIII. For eksempel kan celler som bærer mutasjoner som
- 15 trigger ekspresjon av ellers stille GnTIII, selekteres. For eksempel er CHO-celler kjent for å bære et stille GnTIII-gen som er aktivt i visse mutanter, f. eks. i mutanten Lec10. Dessuten kan fremgangsmåtene som er kjent innen fagområdet anvendes for å aktivere stille GnTIII, inkludert innsettingen av en regulerbar eller konstitutiv promoter, anvendelse av transposoner,
- 20 retrovirale elementer, etc. Anvendelsen av gen-knockout-teknologi eller ribozymfremgangsmåter kan benyttes for å avpasse vertscellens GnTIII ekspresjonsnivå.

Enhver type cellelinje i kultur kan anvendes som bakgrunn for å konstruere

- 25 vertscellelinjene CHO-celler, BHK-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, YO-mylomceller, P3X63-musemyelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, gjærceller eller insektceller kan anvendes. Typisk konstrueres slike cellelinjer for ytterligere å omfatte minst en transfektert nukleinsyre som koder for et helt antistoffmolekyl, et antistoff-fragment
- 30 eller et fusjonsprotein som omfatter et område ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin. I et annet alternativ anvendes en hybridomcellelinje som eksprimerer et bestemt antistoff av interesse som utgangscellelinje for å frembringe de konstruerte vertscellene som tidligere nevnt..

- 35 Typisk koder minst en nukleinsyre i vertscellesystemet for GnT III.

En eller flere nukleinsyrer som koder for GnTIII kan ekspresseres under kontroll av en konstitutiv promoter eller alternativt et regulerbart ekspresjonssystem. Hensiktsmessige regulerbare ekspresjonssystemer omfatter, men er ikke begrenset til et tetrasyklinregulert ekspresjonssystem, et ecdyson-induserbart ekspresjonssystem, et lac-switch ekspresjonssystem, et glukokortikoid-induserbart ekspresjonssystem, et temperatur-induserbart promotersystem, og et metallotionein metallinduserbart ekspresjonssystem. Dersom flere forskjellige nukleinsyrer som koder for GnTIII finnes i vertscellesystemet, kan noen av dem ekspresseres under kontroll av en konstitutiv promoter, mens andre ekspresseres under kontroll av en regulerbar promoter. Det maksimale ekspresjonsnivået anses for å være det høyest mulige nivået av stabil GnTIII-ekspresjon som ikke har en signifikant ugunstig effekt på celleveksthastighet og bestemmes ved anvendelse av rutinemessig eksperimentering. Ekspresjonsnivåene bestemmes ved hjelp av fremgangsmåter som stort sett er kjent innen fagområdet, inkludert Western blot analyse ved anvendelse av et GnTIII-spesifikt antistoff, Northern blot analyse ved anvendelse av en GnTIII-spesifikk nukleinsyreprobe eller målinger av enzymatisk aktivitet. Alternativt kan et lectin som binder til biosyntetiske produkter av GnTIII, for eksempel E₄-PHA lectin, benyttes. I et ytterligere alternativ kan nukleinsyren være operativt bundet til et reporter-gen, ekspresjonsnivåene til det glykoprotein-modifiserende glykosyltransferase bestemmes ved å måle et signal som er korrelert med ekspresjonsnivået til reporter-genet. Reporter-genet kan transkriberes sammen med nukleinsyren(e) som koder for nevnte glykoprotein-modifiserende glykosyltransferase som et enkelt mRNA molekyl, deres respektive kodende sekvenser kan bindes sammen enten med et internt ribosom adgangssete (IRES) eller med en cap-uavhengig translasjonsforsterker (CITE). Reporter-genet kan translateres sammen med minst en nukleinsyre som koder for nevnte GnTIII slik at det dannes en enkel polypeptidkjede. Nukleinsyren som koder for GnTIII kan være operabelt bundet til reporter-genet under kontroll av en enkelt promoter, slik at nukleinsyren som koder for GnTIII, og reporter-genet transkriberes til et RNA molekyl som alternativt spleises til to separate messenger RNA (mRNA) molekyler, hvor et av de resulterende mRNAene translateres til nevnte reporterprotein, og de andre translateres til nevnte GnTIII.

Dersom flere forskjellige nukleinsyrer som koder for et GnTIII ekspresseres, kan de arrangeres på en slik måte at de transkriberes som ett eller som flere mRNA molekyler. Dersom de transkriberes som ett enkelt mRNA molekyl, kan deres respektive kodende sekvenser være bundet sammen enten med et indre ribosomadgangssete (IRES) eller med en cap-uavhengig translasjonsenhancer (CITE). De kan transkriberes fra en enkelt promoter, til et RNA molekyl som alternativt spleises til flere separate messenger RNA

(mRNA) molekyler som deretter translateres til sine respektivt kodende GnTIII hver for seg.

i. Ekspresjonssystemer

- 5 Fremgangsmåter som er godt kjent for en fagmann på området, kan anvendes for å konstruere ekspresjonsvektorer som inneholder den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII samt hensiktsmessige transkripsjons/translasjonskontrollsignaler. Disse fremgangsmåtene omfatter rekombinante *in vitro* DNA teknikker, synteseteknikker og rekombinasjon/genetisk
- 10 rekombinasjon *in vivo*. Se for eksempel teknikkene som er beskrevet i Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) og Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).
- 15 Forskjellige vertekspresjonsvektorsystemer kan benyttes for å ekspressere den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII. Fortrinnsvis anvendes mammalske celler som vertscellesystemer, transfektert med rekombinant plasmid DNA eller cosmid DNA-ekspresjonsvektorer som inneholder den kodende sekvensen til protein av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII. Mest
- 20 foretrukket anvendes CHO-celler, BHK-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, YO-myelomceller, P3X63 muse-myelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, gjærceller eller insektceller som vertscellesystem. I alternative utførelsesformer kan andre eukaryote vertscellesystemer omfattes, inkludert gjærceller som er transformert med rekombinante gjærekspresjonsvektorer som inneholder den
- 25 kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII, insektcellesystemer som er infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f. eks. baculovirus) som inneholder den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII, plantecellesystemer som er infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f. eks. mosaikkvirus fra blomkål, CaMV, tobakk
- 30 mosaikkvirus, TMV) eller som er transformert med rekombinante plasmidekspresjonsvektorer (f. eks. Ti plasmid), som inneholder den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII eller dyrecellesystemer som er infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f. eks. adenovirus, vaccinia virus) inkludert cellelinjer som er konstruert for å inneholde
- 35 multiple kopier av DNA som koder for proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII enten stabilt amplifisert (CHO/dhfr) eller ustabilt amplifisert i doble-minutt kromosomer ("double-minute chromosomes") (f. eks. murine cellelinjer).

Til fremgangsmåtene foretrekkes stort sett stabil ekspresjon fremfor transient ekspresjon på grunn av at det typisk oppnås mer reproducerbare resultater og at den også er mer medgjørilig i storskala-produksjon. Fremfor å anvende ekspresjonsvektorer som
 5 inneholder virale replikasjonsorigo, kan vertscellene transformeres med de respektive kodende nukleinsyrene som kontrolleres av hensiktsmessige ekspresjonskontroll-elementer (f. eks. promoter, enhancer, sekvenser, transkripsjonsterminatorer, polyadenylerings seter, etc.), og en selekterbar markør. Etter innføringen av fremmed DNA, dyrkes de konstruerte cellene i 1-2 dager i et anrikt medium, og deretter flyttes
 10 til et selektivt medium. Den selekterbare markøren i det rekombinante plasmidet gir resistens mot seleksjonen og muliggjør seleksjon av cellene som har plasmidet stabilt integrert i kromosomet deres og dyrke for å danne foci som deretter kan klones og ekspanderes i cellelinjer.

15 Et stort antall seleksjonssystemer kan anvendes, inkludert men ikke begrenset til tymidin kinase fra herpes simplex virus (Wigler et al., Cell 11: 223 (1977)), hypoxantin-guaninfosforibosyltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026 (1962)), og adeninfosforibosyltransferase (Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)) gener som kan benyttes i henholdsvis tk⁻, hgprt⁻ eller aprt⁻-celler. Antimetabolitt-resistens kan
 20 også anvendes som grunnlag for seleksjon for dhfr, som gir resistens mot metotreksat (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567 (1989), O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527(1981)), gpt som gir resistens mot mycofenolinsyre (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)), neo som gir resistens mot aminoglykosid G-418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981)) og hygromycin
 25 som gir resistens mot hygromycin (Santerre et al, Gene 30: 147 (1984)) gener. Nylig er ytterligere selekterbare gener beskrevet, nemlig trpB som gjør det mulig for cellene å benytte indol i stedet for tryptofan, hisD som gjør det mulig for cellene å benytte histinol i stedet for histidin (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8047 (1988)), glutamin syntasesystemet og ODC (ornitin dekarboksylase) som gir resistens
 30 mot ornitindekarboksylaseinhibitoren, 2-(difluormetyl)-DL-ornitin, DFMO (McConlogue, i: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

ii. Identifisering av transfektanter eller transformanter som eksprimerer protein med et modifisert glykosyleringsmønster

35 Vertscellene som inneholder den kodende sekvensen og som eksprimerer de biologisk aktive genproduktene, kan identifiseres ved minst fire generelle fremgangsmåter: (a)

DNA-DNA eller DNA-RNA hybridisering, (b) tilstedeværelsen eller fraværet av "markør" gen-funksjoner, (c) fastsette transkripsjonsnivået målt ved ekspresjon av de respektive mRNA transkripter i vertscellen og (d) deteksjon av genproduktet målt ved immunoanalyse eller ved dets biologiske aktivitet.

5

I den første fremgangsmåten kan tilstedeværelsen av den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvens til GnTIII innsatt i ekspresjonsvektoren, detekteres ved DNA-DNA eller DNA-RNA-hybridisering ved anvendelse av prober som omfatter nukleotidsekvenser som er homologe med henholdsvis de respektive

10 kodende sekvensene eller deler eller derivater derav.

I den andre fremgangsmåten kan det rekombinante ekspresjonsvektor/vertssystemet identifiseres og selekteres basert på tilstedeværelsen eller fraværet av visse "markør" gen-funksjoner (f. eks. tymidinkinase-aktivitet, antibiotika-resistens,

15 metotreksat-resistens, transformasjonsfenotype, dannelse av okklusjonslegeme i baculovirus, etc.). For eksempel dersom den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII settes inn i en markørgensekvens i vektoren, kan rekombinanter som inneholder de respektive kodende sekvensene identifiseres ved fraværet av markørgenfunksjonen. Alternativt kan et markørgen

20 plasseres i tandem med den kodende sekvensen under kontroll av samme eller forskjellige promotere som anvendes for å kontrollere ekspresjonen av de kodende sekvensene. Ekspresjon av markøren som respons på induksjon eller seleksjon, indikerer ekspresjon av den kodende sekvensen til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII.

25

I en tredje fremgangsmåte kan transkripsjonsaktivitet for det kodende området til proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII, måles ved hybridiseringsanalyser. For eksempel kan RNA isoleres og analyseres med Northern blot ved anvendelse av en probe som er homolog med de kodende sekvensene i

30 proteinet av interesse og den kodende sekvensen til GnTIII eller bestemte deler derav. Alternativt kan alle nukleinsyrene fra vertscellen ekstraheres og analyseres mht. hybridisering til slike prober.

I den fjerde fremgangsmåten kan ekspresjonen av proteinproduktene til proteinet av

35 interesse og den kodende sekvensen til GnTIII måles immunologisk, for eksempel med Western blot, immunoanalyser slik som radioimmunopresipitering, enzym-bundede immunoanalyser og liknende. Den ultimate testen på vellykketheten til

ekspresjonssystemet omfatter imidlertid deteksjonen av de biologisk aktive genproduktene.

b. Generering og anvendelse av proteiner og proteinfragmenter med endrede glykosyleringsmønstre

i. Generering og anvendelse av antistoffer med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av glykoformer av antistoffer og antistoff-fragmenter med økt antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet.

Kliniske forsøk med ukonjugerte monoklonale antistoffer (mAb) til behandling av noen krefttyper har nylig gitt lovende resultater. Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12: 223-25 (1997), Deo et al., Immunology Today 18: 127 (1997). Et kimært, ukonjugert IgG1 er godkjent for lav-grad eller follikulær B-celle non-Hodgkins lymfom Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12: 223-25 (1997), mens et annet ukonjugert mAb, et humanisert IgG1 som målsøker faste brysttumorer, også har vist lovende resultater i fase III kliniske forsøk. Deo et al., Immunology Today 18: 127 (1997). Antigenene til disse to mAbene ekspresseres sterkt i de respektive tumorcellene og antistoffene medierer kraftig tumordestruksjon med effektorceller *in vitro* og *in vivo*. I motsetning kan mange andre ukonjugerte mAb med fine tumorspesifisiteter ikke trigge effektorfunksjoner med tilstrekkelig styrke til å være klinisk nyttig. Frost et al., Cancer 80: 317-33 (1997), Surfus et al., J. Immunother. 19: 184-91 (1996). For noen av disse svakere mAb testes for tiden underordnet cytokinterapi. Tilsetning av cytokiner kan stimulere antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) ved å øke aktiviteten og antallet sirkulerende lymfocytter. Frost et al., Cancer 80: 317-33 (1997), Surfus et al., J. Immunother. 19: 184-91 (1996). ADCC, et lytisk angrep på antistoffmålsøkte celler, trigges ved bindingen av leukocyttreseptorer til det konstante området (Fc) i antistoffene. Deo et al., Immunology Today 18: 127 (1997).

En forskjellig, men komplementær fremgangsmåte for å øke ADCC-aktiviteten til ukonjugert IgG1, er å konstruere Fc-området til antistoffet slik at dets affinitet for lymfocyttreseptorene (FcγR) øker. Proteinkonstruksjonsstudier har vist at FcγR interagerer med det nedre hengselområdet i IgG CH2-domenet. Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996). Binding av FcγR krever imidlertid også tilstedeværelsen av oligosakkarider som er kovalent bundet i det konserverte Asn 297 i CH2-området. Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996), Wright og Morrison, Trends Biotech. 15: 26-31

(1997), som foreslår at oligosakkaridet og polypeptidet begge enten bidrar direkte til interaksjonssettet eller at oligosakkaridet er nødvendig for å opprettholde en aktiv CH2 polypeptid-konformasjon. Modifisering av oligosakkaridstrukturen kan derfor undersøkes som et middel for å øke affiniteten til interaksjonen.

5

Et IgG molekyl bærer to N-bundne oligosakkarider i dets Fc-områder, en på hver tunge kjede. Som ethvert glykoprotein, produseres et antistoff som en populasjon av glykoformer som har samme polypeptidskjelettet, men som har forskjellige oligosakkarider bundet i glykosyleringssettene. Oligosakkaridene som normalt finnes i Fc-området i serum IgG er av kompleks bi-antenne type (Wormald et al., Biochemistry 36: 130-38 (1997)), med et lavt nivå av terminal sialsyre og todelt N-acetylglukosamin (GlcNAc), og en variabel grad av terminal galaktosylering og kjernefukosylering. Noen studier tyder på at den minimale karbohydratstrukturen som kreves for FcγR-binding ligger i oligosakkaridkjernen. Lund et al., J.Immunol. 157: 4963-69 (1996). Fjerningen av terminale galaktoser resulterer i tilnærmet en to-gangers reduksjon i ADCC-aktivitet, som indikerer at disse residene har en rolle i binding av FcγR-reseptor. Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996).

De muse- eller hamster-avledede cellelinjene som anvendes i industrien og akademisk til produksjon av ukonjugerte terapeutiske mAb, fester normalt de nødvendige oligosakkarid-determinantene til Fc-setene. IgG som ekspresseres i disse cellelinjene, mangler imidlertid det todelt GlcNAc som finnes i små mengder i serum IgG. Lifely et al., Glycobiology 318: 813-22 (1995). I motsetning ble det nylig observert at et rotte myelom-produsert, humanisert IgG1(CAMPATH-1H) bar et todelt GlcNAc i noen av sine glykoformer. Lifely et al., Glycobiology 318: 813-22 (1995). Antistoffet som er avledet fra rottecelle oppnådde en tilsvarende *in vitro* ADCC-aktivitet som CAMPATH-1H antistoffer som produseres i standard cellelinjer, men i signifikant lavere antistoffkonsentrasjoner.

CAMPATH antigenet er normalt tilstede i høye nivåer på lymfocytter, og dette kimære mAb har høy ADCC-aktivitet i fravær av todelt GlcNAc. Lifely et al., Glycobiology 318: 813-22 (1995). I den N-bundne glykosyleringsreaksjonsveien tilsettes et todelt GlcNAc med enzymet β(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III (GnTIII). Schachter, Biochem. Cell Biol. 64: 163-81 (1986).

35

Foreliggende oppfinnere anvendte en CHO-cellelinje som produserte et enkelt antistoff som tidligere var konstruert for på en eksternt-regulert måte, og ekspressere forskjellige

nivåer av et klonet GnTIII-gen. Denne fremgangsmåten fastslo for første gang en streng korrelasjon mellom ekspresjon av GnTIII og ADCC-aktiviteten til det modifiserte antistoffet.

- 5 Foreliggende oppfinnere viste tidligere at C2B8 antistoff som er modifisert i overensstemmelse med den beskrevne fremgangsmåten, hadde en omkring seksten-ganger høyere ADCC-aktivitet enn standarden, umodifisert C2B8 antistoff som er produsert under identiske cellekultur og rensebetingelser. Kort sagt viste en C2B8 antistoffprøve som er ekspressert i CHO-tTA-C2B8-celler som ikke hadde GnTIII
- 10 ekspresjon, en cytotoksisk aktivitet på omkring 31 % (i en konsentrasjon på 1 µg/ml antistoffkonsentrasjon), målt som *in vitro* lyse av SB-celler (CD20+) med humane lymfocytter. I motsetning viste C2B8-antistoff som er avledet fra en CHO cellekultur som ekspresserer GnTIII i et basalt, overveiende repressert nivå, ved 1 µg/ml antistoffkonsentrasjon en 33% økning i ADCC-aktivitet mot kontrollen ved samme
- 15 antistoffkonsentrasjon. Dessuten produserte en økning av ekspresjonen av GnTIII en stor økning på nesten 80% i den maksimale ADCC-aktiviteten (ved en antistoffkonsentrasjon på 1 µg/ml) sammenlignet med kontrollen ved samme antistoffkonsentrasjon. (Se Internasjonal Publikasjonnr. WO 99/54342). Anvendelse av ytterligere antistoffer i følge oppfinnelsen som har økt antistoff-avhengig cellulær
- 20 cytotoksitet kan omfatte, anti-human neuroblastom monoklonalt antistoff (chCE7) som er produsert ved de beskrevne fremgangsmåtene, et kimært anti-human nyrecellekarsinom monoklonalt antistoff (ch-G250) som er produsert ved fremgangs-måtene, et humanisert anti-HER2 monoklonalt antistoff (f. eks. Trastuzumab (HERCEPTIN)) som er produsert ved fremgangsmåtene et kimært anti-humant
- 25 tykktarm, lunge og brystkarsinom monoklonalt antistoff (ING-1) som er produsert ved fremgangsmåtene, et humanisert anti-humant 17-1A antigen monoklonalt antistoff (3622W94) som er produsert ved fremgangsmåtene, et humanisert anti-humant kolorektaltumor antistoff (A33) som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant melanom antistoff (R24) som er rettet mot GD3 gangliosid som er produsert ved
- 30 fremgangsmåtene og et kimært anti-humant plate-epitelkreft monoklonalt antistoff (SF-25) som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant small cell lungekarsinom monoklonalt antistoff (BEC2, ImClone Systems, Merck KgaA) som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant non-Hodgkins lymfom monoklonalt antistoff (Bexxar (tositumomab, Coulter Pharmaceuticals), Oncolym (Techniclone, Alpha Therapeutic))
- 35 som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant "squamous" celle hode og nakke karsinom monoklonalt antistoff (C225, ImClone Systems) som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant rektalt og tykktarmkarsinom monoklonalt antistoff

(Panorex (edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant ovariekarsinom monoklonalt antistoff (Theragyn, Antisoma) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant akutt myelogen leukemi karsinom monoklonalt antistoff (SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant malignt glioma monoklonalt antistoff (Cotara, Techniclone, Cambridge Antibody Technology) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant B-celle non-Hodgkin lymfom monoklonalt antistoff (IDEC-Y2B8, IDEC Pharmaceuticals) som er produsert ved fremgangsmåtene, et anti-humant faste tumorer monoklonal antistoff (CEA-Cide, Immunomedics) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant kolorektalt karsinom monoklonalt antistoff (Iodine131-MN-14, Immunomedics) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant ovarie, nyre, bryst og prostatakarsinom monoklonalt antistoff (MDX-210, Medarex, Novartis) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant kolorektalt og pankreas karsinom monoklonalt antistoff (TTMA, Pharmacie & Upjohn) som er produsert ved fremgangsmåtene , et anti-humant TAG-72 ekspresserende karsinom monoklonalt antistoff (MDX-220, Medarex) som er produsert ved, et anti-humant EGFr-ekspresserende karsinom monoklonalt antistoff (MDX-447) som er produsert ved fremgangsmåtene, Anti-VEGF monoklonalt antistoff (Genentech) som er produsert ved fremgangsmåtene et anti-humant bryst, lunge, prostata og pankreas karsinom og malign melanom monoklonalt antistoff (BrevaRex, AltaRex) som er produsert ved fremgangsmåtene og et anti-humant akutt myelogen leukemi monoklonalt antistoff (Monoclonal Antibody Conjugate, Immunex) som er produsert ved fremgangsmåtene. I tillegg er oppfinnelsen rettet mot anvendelse av antistofffragment og fusjonsproteiner som omfatter et område som er ekvivalent med Fc-området i immunoglobuliner.

ii. Generering og anvendelse av fusjonsproteiner som omfatter et område som er ekvivalent med et Fc-område i et immunoglobulin som fremmer Fc-mediert cytotoxicitet

Fremgangsmåten som diskutert over angår økning av ADCC-aktiviteten til terapeutiske antistoffer. Dette oppnås ved å konstruere glykosyleringsmønsteret til Fc-området i slike antistoffer, spesielt ved å maksimere den delen av antistoffmolekylene som bærer todelte kompleks oligosakkarider og todelte hybrid oligosakkarider som er N-bundet til de konserverte glykosyleringssetene i Fc-områdene deres. Denne strategien kan anvendes for å øke Fc-mediert cellulær cytotoxicitet mot uønskede celler, mediert av hvilket som helst molekyl som bærer et område som er en ekvivalent med Fc-området i et immunoglobulin, ikke bare av terapeutiske antistoffer, ettersom endringene som er

innført ved konstruksjon av glykosylering, kun påvirker Fc-området og derfor dets interaksjoner med Fc-reseptorene på overflaten av effektorceller som er involvert i ADCC-mekanismen. Fc-inneholdende molekyler som de her beskrevne fremgangsmåtene kan anvendes på, omfatter, men er ikke begrenset til, (a) løselige fusjonsproteiner som er satt sammen av et målsøkende proteindomene som er fusert til N- terminalen i et Fc-område (Chamov og Ashkenazi, Trends Biotech. 14: 52 (1996) og (b) plasmamembran-forankrede fusjonsproteiner som er satt sammen av en type II transmembrant domene som er lokalisert til plasmamembranen som er fusert til N-terminalen i et Fc-område (Stabila, P.F., Nature Biotech. 16: 1357 (1998)).

10

I tilfellet med løselige fusjonsproteiner (a) dirigerer det målsøkende domenet binding av fusjonsproteinet til uønskede celler slik som kreftceller, dvs. på en analog måte som terapeutiske antistoffer. Anvendelsen av her beskrevet fremgangsmåte for å forsterke den Fc-medierte cellulære cytotoksiske aktivitet som medieres av disse molekylene, vil derfor være identisk med fremgangsmåtene som anvendes for terapeutiske antistoffer.

15

I tilfellet med membranforankrede fusjonsproteiner (b) må de uønskede cellene i kroppen ekspressere genet som koder for fusjonsproteinet. Dette kan oppnås enten ved genterapeutiske fremgangsmåter, dvs. ved å transfektore cellene *in vivo* med et plasmid eller virusvektor som dirigerer ekspresjon av det fusjonsproteinkodende genet til uønskede celler eller ved implantering av celler som er genmodifiserte i kroppen for å ekspressere fusjonsproteinet på overflaten deres. De sistnevnte cellene vil normalt implanteres i kroppen i en polymerkapsel (innkapslet celleterapi), hvor de ikke kan ødelegges av en Fc-mediert cellulær cytotoxicitetets mekanisme. Skulle imidlertid kapselanordningen svikte og de rømte cellene bli uønskede, kan de elimineres med Fc-mediert cellulær cytotoxicitet. Stabila et al., Nature Biotech. 16: 1357 (1998). I dette tilfellet vil den her beskrevne fremgangsmåten anvendes enten ved å inkorporere en ekstra genekspresjonskasset i genterapivektoren som dirigerer adekvate eller maksimale ekspresjonsnivåer av GnT III eller ved å konstruere cellene som skal implanteres til å ekspressere adekvate eller maksimale nivåer av GnT III. I begge tilfellene er hensikten med den beskrevne fremgangsmåten å øke eller maksimere andelen av overflate-uttrykte Fc-områder som bærer todelte kompleks oligosakkarider og/eller todelte hybrid oligosakkarider.

20

25

Eksemplene nedenfor forklarer oppfinnelsen mer detaljert. Følgende forberedelser og eksempler er gitt for å sette en fagmann på området i stand til mer tydelig å forstå og å utføre foreliggende oppfinnelse.

30

Eksemplene nedenfor forklarer oppfinnelsen mer detaljert. Følgende forberedelser og eksempler er gitt for å sette en fagmann på området i stand til mer tydelig å forstå og å utføre foreliggende oppfinnelse.

35

EKSEMPEL 1

Nye versjoner av det kimære anti-CD20 antistoffet IDEC-C2B8 med forsterket antistoff-avhengig cellulær cytotoksitet som er oppnådd ved
 5 glykosyleringskonstruksjon av en IDEC-CEB8-produserende cellelinje.

Syntese av VH og VL-kodende områder i IDEC-C2B8 og konstruksjon av mammalske ekspresjonsvektorer. cDNA som koder for VH og VL-områder i IDEC-C2B8 antistoff ble samlet inn fra et sett overlappende enkelttrådede oligonukleotider i en en-trinns
 10 prosess ved anvendelse av PCR (Kobayashi, N., et al. Biotechniques 23: 500-503 (1997)). De opprinnelige sekvensdata som koder for IDEC-C2B8 VL og VH ble skaffet fra en publisert internasjonal patentsøknad (Internasjonal Publiseringssnr.: WO94/11026). Sammenmonterte ("assembled") VL og VH cDNA-fragmenter ble subklonet i pBluescriptIIKS (+), sekvensert og direkte forbundet ved ligering med
 15 cDNA fra henholdsvis den humane konstante lette (Igκ) og tunge (IgG1) kjeden, ved anvendelse av unike restriksjonssteder som er innført i forbindelsespunktene i de variable og konstante områdene uten å endre den opprinnelige aminosyresekvensen (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999), Reff, M. E., et al., Blood 53: 435-445 (1994)). Hvert fullengde cDNA ble subklonet separat i pcDNA3.1(+) (Invitrogen,
 20 Leek, Nederland) og ga mammalske ekspresjonsvektorer for kimære C2B8 lette (pC2B8L) og tunge (pC2B8H) kjeder.

Produksjon av IDEC-C2B8 i CHO-celler som eksprimerer forskjellige nivåer GnTIII. Etableringen av to CHO-cellelinjer, CHO-tet-GnTIII som eksprimerer forskjellige
 25 nivåer av GnTIII avhengig av tetrasyklinkonsentrasjonen i kulturmediumet samt CHO-tTA, den parentale cellelinjen som ikke eksprimerer GnTIII, er tidligere beskrevet (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999), Umana, P., et al., Biotechnol Bioeng. 65: 542-549 (1999)). Hver cellelinje ble ko-transfektet med vektorene pC2B8L, pC2B8H og pZeoSV2(+) (for Zeocin-resistens, Invitrogen, Leek, Nederland)
 30 ved anvendelse av en kalsiumfosfatmetode. Zeocin-resistente kloner ble overført til en 96-brønners plate og analysert mht. IDEC-C2B8 produksjon ved anvendelse av en ELISA-analyse som er spesifikk for det humane konstante området (4). Tre IDEC-C2B8 prøver ble fremstilt fra parallelle kulturer av en selektert klon (CHO-tet-GnTIII-C2B8), som kun er forskjellig i tetrasyklinkonsentrasjonen som settes til mediumet
 35 (henholdsvis 25, 50 og 2000 ng/mL). Kultursupernatantene ble høstet i sen eksponensiell fase. En ytterligere antistoffprøve ble fremstilt fra en CHO-tTA-avledet klon, CHO-tTA-C2B8, som var dyrket under identiske betingelser, men uten å tilsette

tetrasyklin til mediumet. Antistoffprøver ble rensset fra kulturmediumet med protein A affinitetskromatografi og bufferbyttet til PBS på en kationbytterkolonne slik som tidligere beskrevet (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999)).

Antistoffkonsentrasjon ble målt ved anvendelse av et fluorescensbasert kit fra Molecular Probes (Leiden, Nederland) med Rituximab anvendt som standard.

Indirekte immunofluorescens. CD20-positive celler (SB celler, ATCC deponeringsnr. ATCC CCL120) og CD20-negative celler (HSB-celler, ATCC deponeringsnr. ATCCCCL120.1) ble inkubert hver for seg i 1 time med 2.5 µg/ml CHO-tet GnTIII-avledet IDEC-C2B8 antistoff i Hanks balanserte saltløsning (Gibco BRL, Basel, Sveits) og 2% bovin serumalbumin fraksjon V (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Sveits) (HBSSB). Som negativ kontroll ble HBSSB anvendt i stedet for C2B8 antistoff. Et PITC-konjugert, anti-humant Fc polyklonalt antistoff ble anvendt som et sekundært antistoff (SIGMA, St. Louis) for alle prøvene. Cellene ble undersøkt ved anvendelse av et Leica fluorescensmikroskop (Wetzlar, Tyskland).

Oligosakkaridprofil med MALDI/TOF-MS. Nøytrale, N-bundne oligosakkarider ble avledet fra C2B8 antistoffprøver, MabTheraTM (Europisk motpart til Rituximab, gave fra R. Stahel, Universititätsspital, Sveits), C2B8-25t, C2B8-50t, C2B8-2000t og C2B8-nt, (100 µg av hver) slik som tidligere beskrevet (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999)). Kort sagt ble antistoffprøvene først behandlet med Arthrobacter ureafaciens sialidase (Oxford Glycosciences, Abingdon, Storbritannia) for å fjerne alle sialsyre monosakkaridresidier. Nøytrale N-bundne oligosakkarider ble deretter frigitt fra de desialyerte antistoffprøvene ved anvendelse av peptid-N-glykosidase F (Oxford Glycosciences), rensset ved anvendelse av mikrokolonner og analysert med MALDI/TOF-MS i et Elite Voyager 400 spektrometer (Perseptive Biosystems, Farmingham, MA).

ADCC-aktivitetsanalyse. Perifere blodmononukleære celler (PBMC) ble separert fra heparinisert ferskt humant blod (fra den samme friske donoren i alle forsøkene) ved sentrifugering over en Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Dübendorf, Sveits) gradient. PBMC (effektor) ble tømt for monocytter ved plastikk adhering. CD20-positive SB (mål) celler ble merket i 90min med 100 µCi ⁵¹Cr (Amersham, Dübendorf, Sveits) ved 37°C, vasket to ganger i RPMI (GibcoBRL, Basel, Sveits) og resuspendert i en konsentrasjon på 10⁵ celler/ml. 50 mikroliter C2B8 mAb fortynnet i RPMI-medium ble satt til 100 µl SB-celler (10 000 celler/brønn) i en 96-brønners rundbundet mikrotiterplate (Greiner, Langenthal, Sveits), sentrifugert ved 50xg i 1minutt, og

inkubert i 1 time ved 4°C. Deretter ble 50 µl effektorceller (suspendert med 2×10^7 celler/ml i RPMI medium) satt til hver av de 96-brønnene som gir et endelig E:T forhold på 100. Platene ble inkubert i 4 timer ved 37°C og 5% CO₂, supernatanten ble høstet med et Skatron høstingssystem (Skatron Instruments, Sterling, VA) og telt (ER, eksperimentell frigivning) i en Cobra 05005 γ-teller (Canberra Packard, Meriden, CT). Maksimal (MR) og spontan (SR) frigivning oppnås ved å tilsette henholdsvis 100 µl 1% Nonidet (Sigma, St. Louis) eller 100 µl RPMI medium, i stedet for C2B8 mAb, til 100 µl merkede målceller. Alle datapunkter ble utført i triplikat. Spesifikk lyse(%) ble beregnet med følgende formel: $(ER-SR)/(MR-SR) \times 100$.

10

Resultater og diskusjon

Produksjon av IDEC-C2B8 og verifisering av spesifikk antigenbinding. CHO-tet-GnTIII-celler med stabil, tetrasyklinregulert ekspresjon av GnTIII og stabil, konstitutiv ekspresjon av IDEC-C2B8, ble etablert og oppskalert for produksjon av et sett antistoffprøver. Iløpet av oppskaleringen ble parallelle kulturer fra samme klon dyrket under tre forskjellige tetrasyklinkonsentrasjoner, 25, 50 og 2000 ng/ml. Disse tetrasyklinnivåene er tidligere blitt vist å resultere i forskjellige nivåer av GnTIII og todelte oligosakkarider (Umana, P. et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999), Umana, P., et al., Biotechnol Bioeng. 65: 542-549 (1999)). En C2B8-produserende kontrollcellelinje som ikke ekspresserer GnTIII ble også etablert og dyrket under samme betingelser som for de tre parallelle CHO-tet-GnTIII-kulturene. Etter Protein A-affinitetskromatografi, ble mAb renheten estimert til å være høyere enn 95% med SDS-PAGE og Coomassie-blå farging. Prøvene ble gitt navn i samsvar med tetrasyklinkonsentrasjonen som er tilsatt dyrkningsmediumet for produksjon: C2B8-25t, C2B8-50t, C2B8-2000t og C2B8-nt (dvs. ingen tetrasyklin til den ikke-todelt kontrollen). Prøve C2B8-25t viste spesifikk antigenbinding ved indirekte immunofluorescens ved anvendelse av CD20-positive og CD20-negative celler (Fig. 1), som indikerer at de syntetiserte VL og VH-genfragmentene ble funksjonelt riktige.

30

Oligosakkaridprofil med MALDI/TOF-MS. Glykosyleringsprofilen til hver antistoffprøve ble analysert med MALDI/TOF-MS av den frigitte, nøytrale oligosakkaridblandingen. I denne teknikken fremkommer oligosakkarider med forskjellig masse som separate topper i spekteret og deres andel reflekteres kvantitativt ved den relative topphøyden (Harvey, D. J., Rapid Common Mass Spectrom. 7: 614-619 (1993), Harvey, D. J., et al., Glycoconj J. 15: 333-338 (1998)).

35

Oligosakkaridstrukturene ble fastsatt til de forskjellige toppene basert på deres forventede molekyllmasser, tidligere strukturelle data for oligosakkaridene som er

avledet fra IgG1 mAb som er produsert i samme vert, og informasjon om den N-bundne oligosakkarid biosyntetisk reaksjonsvei.

Det ble funnet en tydelig korrelasjon mellom GnTIII ekspresjonsnivåer (dvs. tetrasyklinkonsentrasjon) og mengde todelte oligosakkarider som er avledet fra de forskjellige antistoffprøvene. Som forventet bar ikke MabThera™ og C2B8-nt, som er avledet fra verter som ikke ekspresserer GnTIII, todelte oligosakkarider (Fig. 2A og 2B). I motsetning utgjorde todelte strukturer opp til tilnærmet 35% av oligosakkaridpoolen i prøven C2B8-2000t, dvs et basalnivå av GnTIII ekspresjon. I dette tilfellet var de hoved todelte oligosakkaridtoppene av kompleksstype, utvetydig fastsatt til toppene ved m/z 1689 og m/z 1851 (fig. 2C). Det neste GnTIII-ekspresjonsnivået, prøve C2B8-50t, førte til en økning i disse toppene (inkludert deres assosierte kaliumaddukter på m/z 1705 og 1861) på rundt 20%. Denne økningen ble ledsaget av en samtidig reduksjon av deres ikke-todelte motparter på henholdsvis m/z 1486 og 1648 (Fig. 2D). Ved det høyeste GnTIII ekspresjonsnivået, prøve C2B8-25t, sank hovedsubstratet for GnTIII, m/z 1486, nesten til grunnlinjenivå, mens kompleks todelte strukturer (m/z 1689 og 1851) sank til fordel for økningene i toppene ved m/z 1664, 1810 og 1826 (Fig. 2E). Disse toppene kan enten fastsettes til todelte hybridforbindelser, til galaktosylerte kompleks oligosakkarider eller til en blanding av begge. Deres relative økning er imidlertid i overensstemmelse med akkumuleringen av todelte hybridforbindelser da GnTIII overekspresjon kan omdirigere den biosyntetiske fluksen på tidlige trinn i reaksjonsveien (se Fig. 3A og 3B). Mengden av todelte oligosakkaridstrukturer (kompleks og hybridtype) nådde tilnærmet 80% for denne prøven.

ADCC-aktiviteten til IDEGC2B8 glykosylerte varianter. Forskjellige C2B8 mAb glykosyleringsvarianter ble sammenlignet mht. ADCC-aktivitet, målt som *in vitro* lysering av CD20-positive SB-celler. En ytterligere mAb-prøve, C2B8-nt, som er avledet fra den parentale cellelinjen som mangler GnTIII, ble også undersøkt. Prøve C2B8-2000t som produseres på det basale GnTIII ekspresjonsnivået og som bærer lave nivåer av todelte oligosakkarider, var litt mer aktiv enn C2B8-nt (Fig. 4A). På det neste nivået av GnTIII-ekspresjon, bar prøve C2B8-50t tilnærmet like nivåer av todelte og ikke-todelte oligosakkarider, men medierte ikke signifikante høyere lysering av målcelle. Ved den laveste tetrasyklinkonsentrasjonen var imidlertid prøve C2B8-25t, som inneholdt opp til 80% av todelte oligosakkaridstrukturer, signifikant mer aktiv enn resten av prøvene i hele antistoffkonsentrasjonsområdet. Det nådde maksimalt ADCC-aktivitetsnivå for prøve C2B8-nt ved en 10-ganger lavere antistoffkonsentrasjon (Fig.

4A). Prøve C2B8-25t viste også en signifikant økning i den maksimale ADCC-aktiviteten med hensyn til kontrollen (50% mot 30% lysering).

Prøvene C2B8-50t og C2B8-25t som bærer de høyeste andelene av todelte oligosakkarider, ble ytterligere sammenlignet mht. ADCC-aktivitet med MabtheraTM, versjonen av Rituxan som for tiden markedsføres i Europa (Fig. 4B). Prøve C2B8-50t viste en liten økning i aktivitet, mens prøve C2B8-25t tydelig utkonkurrerte MabtheraTM ved alle antistoffkonsentrasjoner. Tilnærmet en fem til ti-ganger lavere konsentrasjon av C2B8-25t var nødvendig for å nå maksimal ADCC-aktivitet med MabtheraTM, og den maksimale aktiviteten til C2B8-25t var omkring 25% høyere enn den til MabtheraTM.

Disse resultatene viser stort sett at *in vitro* ADCC-aktiviteten til C2B8-antistoffet korrelerer med den andelen av molekylerne som bærer todelte oligosakkarider i Fc-området. Vi har tidligere rapportert at i tilfellet med chCE7, et antistoff med en lav ADCC-aktivitet på grunnlinjenivå, kan signifikante økninger i aktivitet oppnås ved å øke fraksjonen av todelte oligosakkarider over nivåene som finnes i naturligforekommende antistoffer (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999)). Det samme er tilfellet for C2B8 mAb, som allerede har høy ADCC-aktivitet i fravær av todelte oligosakkarider. I tilfellet med chCE7, ble imidlertid svært store økninger i ADCC-aktivitet observert på et nivå av GnTIII-ekspresjon hvor todelte oligosakkarider overveiende var av kompleks type (Umana, P., et al., Nat Biotechnol. 17: 176-180 (1999)). For det potente C2B8 mAb, ble en slik stor boost i aktivitet kun observert på de høyeste GnTIII ekspresjonsnivåene som er studert, hvor todelte oligosakkarider hovedsakelig hadde shiftet til hybridtypen (Fig. 2). For begge mAbene hadde prøvene med de høyeste aktivitetene vesentlig høyere nivåer av todelte enn ikke-todelte oligosakkarider. Sammen indikerer disse observasjonene at både kompleks og hybrid todelte oligosakkarider sannsynligvis er viktig for ADCC-aktivitet.

I både komplekse og hybride oligosakkarider fører et todelt GlcNAc til en stor endring i oligosakkarid-konformasjonene (Balaji, P. V., et al., Int. J. Biol. Macromol. 18: 101-114 (1996)). Endringen forekommer i en del av oligosakkaridet som i stor utstrekning interagerer med polypeptidet i CH2-domenet (Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163: 59-76 (1998)). Da polypeptidet er relativt fleksibelt i dette punktet (Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163: 59-76 (1998)), er det mulig at det todelte N-acetylglukosaminet medierer sine biologiske effekter gjennom en konformasjonsendring i Fc-området. De potensielt endrede konformasjonene vil allerede finnes i naturen, ettersom alle IgG i serum bærer todelte oligosakkarider. Hovedforskjellen mellom de konstruerte og

naturlige antistoffene vil være andelen av molekyler som uttrykker ("displaying") de mer aktive konformasjonene.

Forskjellige fremgangsmåter for å øke aktiviteten til ukonjugerte mAb er for tiden under
 5 klinisk evaluering, inkludert radio-immunoterapi, antistoff-avhengig enzym/prolege-
 middelterapi, immunotoksiner og adjuvans-terapi med cytokiner (Hjelm Skog, A., et al.,
 Cancer Immunol Immunother. 48: 463-470 (1999), Blakey, D. C., et al., Cell Biophys.
 25: 175-183 (1994), Wiseman, G. A., et al., Clin Cancer Res. 5: 3281s-3296s (1999),
 Hank, J. A., et al., Cancer Res. 50: 5234-5239 (1990)). Disse teknologiene kan gi store
 10 økninger i aktivitet, men de kan også føre til signifikant høyere bivirkninger, høyere
 produksjonskostnader og kompleks logistikk fra produksjon til administrering til
 pasienter sammenlignet med ukonjugerte mAb. Teknologien som presenteres her tilbyr
 en alternativ måte å oppnå økninger i styrke mens det opprettholdes en enkel
 produksjonsprosess og bør være anvendelig for mange ukonjugerte mAb.

15

EKSEMPEL 2

Nye versjoner av anti-nyrecellekarsinom antistoffet chG250 som har forsterket
 antistoff-avhengig cellulær cytotoxiskitet oppnådd ved glykosyleringsmodifisering av en
 chG250-produserende cellelinje

20

1. Cellekultur

SP2/0 musemyelomceller som produserer chG250 kimært mAb (wt-chG250-SP2/0
 celler) ble dyrket i standard cellekulturmedium tilsatt 1:100 (v/v) penicillin/strepto-
 mycin/antimycotisk løsning (SIGMA, Buchs, Sveits). Cellene ble dyrket ved 37°C i en
 25 5% CO₂ fuktet atmosfære i vevskulturflasker. Mediumet ble byttet hver 3-4 dag.
 Cellene ble frosset i kulturmedium som inneholdt 10% DMSO.

2. Generering av SP2/0-celler med ekspresjon av pGnTIII-puro

wt-chG250-SP2/0 myelomceller ble transfektert ved elektroporering med en vektor for
 30 konstitutiv ekspresjon av GnTIII som var operabelt bundet via en IRES til et
 puromycin-resistensgen. 24 timer før elektroporering ble dyrkningsmediumet byttet og
 cellene ble sådd med 5×10^5 celler/ml. Sju millioner celler ble sentrifugert i 4 minutter
 ved 1300 rpm ved 4°C. Cellene ble vasket med 3 mL nytt medium og sentrifugert igjen.
 Cellene ble resuspendert i et volum på 0.3-0.5 ml reaksjonsblanding som inneholdt
 35 1.25% (v/v) DMSO og 20-30 µg DNA i kulturmedium. Elektroporeringsblandingen ble
 deretter overført til en 0.4 cm kuvette og pulset ved lav spenning (250-300 V) og høy
 kapasitans (960 µF) ved anvendelse av Gene Pulser fra BioRad. Etter elektroporering

ble cellene raskt overført til 6 mL 1.25% (v/v) DMSO dyrkningmedium i en T25 dyrkningsflaske og inkubert ved 37°C. Stabile integranter ble selektert ved å påføre 2 µg/mL puromycin på mediumet to dager etter elektroporering. Etter 2-3 uker ble en stabil, puromycin-resistent blandet populasjon oppnådd. Enkeltcelle avledede kloner ble
 5 oppnådd via FACS og ble deretter ekspandert og opprettholdt under puromycinseleksjon.

3. Western Blot

Puromycin-resistente kloner ble screenet mht. GnTIII-ekspressjon med Western blotting.
 10 Western blottene viste tydelig at klonene 5H12, 4E6 og 4E8 ekspresserte de høyeste GnTIII-nivåene. 5G2 viste også et GnTIII-bånd med middels intensitet, mens 2F1, 3D3 og 4G3 hadde de laveste båndintensitetene og ekspresserer derfor lavere mengder GnTIII (Fig. 5).

15 4. Produksjon og rensing av chG250 monoklonalt antistoff fra sju GnTIII-ekspresserende kloner inkludert villtype

Klonene 2F1, 3D3, 4E6, 4E8, 4G3, 5G2, 5H12 og villtypen (wt-chG250-SP2/0-celler) ble sådd med 3×10^5 celler/mL i et totalt volum på 130 ml dyrkningsmedium, og dyrket i enkelt Triple-kolber. Cellene som ble anvendt til såing var alle i full eksponensiell
 20 vekstfase, derfor ble cellene ansett for å være i samme veksttilstand når produksjonsbatchene startet. Cellene ble dyrket i 4 dager. Supernatanter som inneholdt antistoffet ble samlet i sen eksponensiell vekstfase for å sikre reproduserbarhet. Det chG250 monoklonale antistoffet ble renset i to kromatografitrinn. Kultursupernatanter som inneholder det chG250 monoklonale antistoffet som er avledet fra hver batch ble
 25 først renset ved anvendelse av HiTrap ProteinA affinitetskromatografi. ProteinA er svært spesifikk for det humane IgG F_c-området. Oppsamlede prøver fra proteinA eluatet ble buffer-byttet til PBS med kation-bytterkromatografi på en ResourceS 1ml kolonne (Amersham Pharmacia Biotech). Endelig renhet ble bestemt til å være høyere enn 95% med SDS-farging og Coomassie blå farging (Fig. 6). Konsentrasjonen av hver prøve ble
 30 bestemt med en standard kalibreringskurve ved anvendelse av villtype antistoff med kjent konsentrasjon.

5. Oligosakkaridprofil til mAb-preparater som er avledet fra de sju klonene som ekspresserer ulike GnTIII-nivåer

35 Oligosakkaridprofilene ble fremstilt ved matriks-assistert laser desorpsjon/ioniseringstid til flyt ("flight") massespektrometri (MALDI/TOF-MS), som nøyaktig tilveiebringer molekyllmassene til de forskjellige oligosakkaridstrukturene. Denne teknikken

muliggjør en kvantitativ analyse av proporsjonene mellom forskjellige oligosakkaridstrukturer i en blanding. Nøytrale oligosakkarider viser seg hovedsakelig som $[M + N^+]$ ioner, noen ganger er de imidlertid fulgt av mindre $[M + K^+]$ ioner som fører til en økning i masse på m/z på 16. Prosentandelen av strukturen som fremkommer

5 som kaliumionaddukter avhenger av innholdet av matriks og kan således variere mellom prøvene. En blanding av nøytralt N-bundede oligosakkarider som er avledet fra hvert antistoffpreparat ble analysert ved anvendelse av 2,5-dehydrobenzosyre (2,5-DHB) som matriks. Noen av toppene i spekteret ble klart tilskrevet spesifikke oligosakkaridstrukturer på grunn av kjent monosakkaridsammensetning og unik masse.

10 Noen ganger kunne imidlertid multiple strukturer tilskrives en bestemt masse. MALDI muliggjør bestemmelsen av massen og kan ikke skille mellom isomerer. Kunnskap om den biosyntetiske reaksjonsveien og tidligere strukturelle data gjør det i de fleste tilfellene mulig å fastsette en oligosakkaridstruktur til en topp i spekteret. Oligosakkarider som er avledet fra mAb prøven som er produsert i wt-chG250-SP2/0

15 cellelinjen som ikke ekspresserer GnTIII, inneholdt ikke-todelte biantenne kompleks (m/z 1486) og mono- eller di-galaktosylert ikke-todelte biantenne kompleksstrukturer (Fig. 7A), begge $\alpha(1,6)$ -fukosylert i kjerneområdet (henholdsvis toppene m/z 1648 og 1810).

20 Ekspresjon av GnTIII produserte todelte Fc-assosierte oligosakkaridstrukturer av to typer: kompleks eller hybrid. Komplekse todelte oligosakkarider ble utvetydig fastsatt til toppene på m/z 1543, 1689, 1705, 1851 og 1867 ($[M + K^+]$ addukt). Som forventet var økningen i todelte oligosakkarider fulgt av en samtidig reduksjon av toppene m/z 1486 og 1648, som korresponderer til ikke-todelte kompleks oligosakkarider. For alle

25 prøvene som er avledet fra de GnTIII-ekspresserende klonene, sank hovedsubstratet til GnTIII (m/z 1486) dramatisk. Som forventet hadde prosentandelen av den ikke-todelte kompleks oligosakkaridtypen, fastsatt til topp på m/z 1648, de laveste verdiene for klonene som ekspresserer de høyeste GnTIII nivåene (klonene 4E6, 4B8, 5G2 og 5H12). Disse to toppene sank til fordel for akkumuleringen av todelte kompleks og todelte

30 hybrid type oligosakkarider (Fig. 7A-7D og 8A-8D). Prosentandelen av todelte kompleks oligosakkarider var høyere for prøvene som var avledet fra klonene som ekspresserer lavere mengder GnTIII. Dette er i overensstemmelse med det faktum at et høyere GnTIII ekspresjonsnivå sannsynligvis forskyver den biosyntetiske fluksen mot todelte hybridstrukturer, og senker derved det relative forholdet mellom kompleks og kompleks

35 todelte forbindelse. For todelte hybridstrukturer, kan noen ganger to mulige strukturer fastsettes til en enkelt topp. Derfor ble det foretatt noen antagelser for å approksimere prosentandelen til disse strukturene i den totale oligosakkaridpoolen. Toppene m/z

1664, 1680, 1810 og 1826 kan fastslås enten til todelt hybridtype, til galaktosylert komplekse oligosakkarider eller en blanding av dem. På grunn av det faktum at wt-antistoffpreparatet hadde en relativ lav prosentandel i topp 1664, det ble antatt at denne toppen som fremkommer i signifikante mengder i antistoff-prøvene som er avledet fra de forskjellige klonene, i sin helhet korresponderte til todelte hybridstrukturer (Fig. 7A-7D og 8A-8D). For å fastsette en spesifikk struktur til toppene m/z 1810 og 1826, må ytterligere karakterisering utføres. Til oppsummering kan sies at ved overekspressjon av GnTIII, genereres todelte oligosakkaridstrukturer og deres relative proporsjoner korrelerer med GnTIII ekspresjonsnivåer.

10

6. Måling av antistoffmediert cytotoxisk aktivitet ved Calcein-AM retensjon

Calcein-AM retensjonsmetoden for å måle cytotoxiskitet måler fluorescensfargen som er igjen i cellene etter inkubering med antistoffet. Fire millioner G250 antigen-positive celler (mål) ble merket med 10 µM Calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) i 1.8 mL RPMI-1640 cellekulturmedium (GIBCO BRL, Basel, Sveits) tilsatt 10% fetalt kalveserum i 30 minutter ved 37°C i en 5%CO₂ fuktet atmosfære. Cellene ble vasket to ganger i kulturmedium og resuspendert i 12 mL AIMV serumfritt medium (GIBCO BRL, Basel, Sveits). Merkede celler ble deretter overført til U-bundet 96-brønner (30 000 celler/brønn) og inkubert i triplikat med forskjellige antistoff-konsentrasjoner i 1 time ved 4°C. Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) ble separert fra heparinert ferskt humant blod (som er fremstilt fra samme friske donor i alle forsøkene) ved sentrifugering over en Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Dubendorf, Sveits) gradient. PBMC ble tilsatt i triplikatbrønner i et 50 µL volum, som gir et effektor til mål-forhold (E:T forhold) på 25:1 og et endelig volum på 200 µL. 96-brønners platen ble deretter inkubert i 4 timer ved 37°C i en 5%CO₂ atmosfære. Deretter ble 96-brønnersplaten sentrifugert ved 700 x g i 5 minutter og supernatantene kastet. Cellepelletene ble vasket to ganger med Hanks balanserte saltløsning (HBSS) og lysert i 200 µL 0.05 M natriumborat, pH 9, 0.1% TritonX-100. Retensjon av fluorescens-fargen i målcellene ble målt med en FLUOstar mikropplateleser (BMG LabTechnologies, Offenburg, Tyskland). Den spesifikke lyseringen ble beregnet relativt til en total lyseringskontroll som resulterer fra eksponering av målcellene for saponin (200 µg/mL i AIMV, SIGMA, Buchs, Sveits) i stedet for eksponering for antistoff. Spesifikk lysering (%) ble beregnet med følgende formel:

35

$$\% \text{ Cytotoksitet} = \frac{F_{\text{med}} - F_{\text{eksp}}}{F_{\text{med}} - F_{\text{det}}}$$

hvor F_{med} representerer fluorescensen til målcellene som er behandlet med medium alene og tar uspesifikk lysing av PMBC i betraktning, F_{eksp} representerer fluorescensen av cellene som er behandlet med antistoff og F_{det} representerer fluorescensen av celler som er behandlet med saponin i stedet for antistoff.

5

For å bestemme effekten av modifiserte glykosyleringsvarianter av chG250 på *in vitro* ADCC-aktiviteten, ble G250 antigen-positive målceller dyrket med PBMC med og uten chG250 antistoffprøver ved forskjellige konsentrasjoner. Cytotoksisiteten til umodifisert chG250 antistoff som er avledet fra villtype cellelinjen ble sammenlignet med to
 10 antistoffpreparater som er avledet fra to cellelinjer (3D3, 5H12) som ekspresserer henholdsvis intermediate og høye GnTIII-nivåer (se Fig. 5).

Umodifisert chG250 antistoff medierte ikke signifikant ADCC-aktivitet over hele konsentrasjonsområdet som ble anvendt i analysen (aktiviteten var ikke signifikant
 15 forskjellig fra bakgrunnen). Forstørret ADCC-aktivitet (nær 20%, se Fig. 9) ved 2 $\mu\text{g/mL}$ ble observert med antistoff-prøven som er avledet fra klon 3D3, som ekspresserte intermediate GnTIII-nivåer. Den cytotoksiske aktiviteten til disse antistoffprøvene vokste ikke ved høyere antistoff-konsentrasjoner. Som forventet viste antistoffpreparatene som er avledet fra klon 5H12 en påfallende økning i forhold til
 20 3D3-prøvene og umodifisert antistoff i dets evne til å mediere ADCC mot målcellene. Den maksimale ADCC-aktiviteten til dette antistoffpreparatet var rundt 50% og var bemerkelsesverdig i mediering av en signifikant ADCC-aktivitet når det var 125-ganger mindre konsentrert enn den umodifiserte kontrollprøven.

25 EKSEMPEL 3

Behandling av immunmediert trombocytopeni i en pasient med kronisk graft-versus-host sykdom

Autoimmun trombocytopeni i kronisk graft-versus-host sykdom representerer et tilfelle av B-celle dysregulering som fører til klinisk sykdom. For å behandle immunmediert
 30 trombocytopeni i et individ med kronisk graft-versus-host sykdom, administreres et anti-CD20 kimært monoklonalt antistoff som er fremstilt ved fremgangsmåtene som beskrevet over og som har økt ADCC, til individet slik som beskrevet i Ratanatharathorn, V. et al., Ann. Intern. Med. 133 (4): 275-79 (2000) (hvor hele innholdet herved inkorporeres som referanse). Spesifikt administreres en ukentlig
 35 infusjon av antistoffet, 375 mg/m^2 til individet i 4 uker. Antistoffterapien produserer en tydelig deplering av B-celler i det perifere blodet og nedsatte nivåer av blodplate-assosiert antistoff.

EKSEMPEL 4**Behandling av alvorlig, immunmediert, erytroaplasti ("Pure Red Cell Aplasia", PRCA) og hemolytisk anemi**

- 5 Immunmediert, ervervet erytroaplasti er en sjelden forstyrrelse som hyppig er assosiert med andre autoimmune fenomener. For å behandle immunmediert ervervet erytroaplasti i et individ administreres et anti-CD20 kimært monoklonalt antistoff, som er fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge beskrivelsen over og som har økt ADCC, til individet slik som beskrevet i Zecca, M. et al., Blood 12: 3995-97 (1997) (hvor hele innholdet herved
- 10 inkorporeres som referanse). Spesifikt gis et individ med PRCA og autoimmun hemolytisk anemi to doser antistoff, 375mg/m^2 , pr. uke. Etter antistoff-behandlingen startes substitutiv behandling med intravenøs immunoglobulin. Denne behandlingen produserer en tydelig deplering av B-celler og en signifikant økning i retikulocyt-tall som er fulgt av økte hemoglobinnivåer.

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av et glykomodifisert antistoff for fremstilling av en farmasøytisk
5 sammensetning for å behandle:

- i) cancer,
 - ii) autoimmune trombocytopeni i kronisk "graft-versus-host" sykdom; eller
 - iii) immunformidlet, ervervet ekte rødcelle aplasi,
- hvor antistoffet spesifikt binder til humant CD20 antigen, hvor antistoffet har en
10 minsket del av ikke-halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdi på 1648 Dalton og en økt del av enten halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1689, 1705, 1851 og 1867 Dalton eller halverte hybrid og galaktosylert kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1664, 1810 og 1826 Dalton relativ til et korresponderende ikke-glykomodifisert anti CD20 antistoff.

15

2.

Glykomodifisert antistoff for anvendelse i behandling av:

- i) cancer,
 - ii) autoimmune trombocytopeni i kronisk "graft-versus-host" sykdom eller
 - 20 iii) immunformidlet, ervervet ekte rødcelle aplasi,
- hvor antistoffet spesifikt binder til humant CD20 antigen, hvor antistoffet har en minsket del av ikke-halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdi på 1648 Dalton og en økt del av enten halverte kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1689, 1705, 1851 og 1867 Dalton eller halverte hybrid og galaktosylert
25 kompleks oligosakkarider som har m/z verdier på 1664, 1810 og 1826 Dalton relativ til et korresponderende ikke-glykomodifisert anti CD20 antistoff.

3.

Anvendelse i følge krav 1, hvor antistoffet er et kimært anti-humant CD20 monoklonalt
30 antistoff.

4.

Anvendelse i følge krav 1 eller 3, hvor antistoffet er et antistoff-fragment som omfatter et spesifikt bindingssete.

35

5.

Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvori antistoffet er et fusjonsprotein som omfatter Fc regionen til et immunoglobulin.

5 6.

Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1, eller 3-5, hvori mer enn 50% av oligosakkaridene i Fc regionen til antistoffet er halvert.

7.

10 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-5, hvori mer enn 70% av oligosakkaride i Fc regionen til antistoffet er halvert.

8.

15 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-7, hvori canceren er B celle lymfom.

9.

20 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-8, hvori nevnte antistoff har minst to ganger ADCC aktiviteten til det korresponderende antistoffet som ikke har blitt glykomodifisert.

10.

25 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-8, hvori nevnte antistoff har minst tre ganger ADCC aktiviteten til det korresponderende antistoffet som ikke har blitt glykomodifisert.

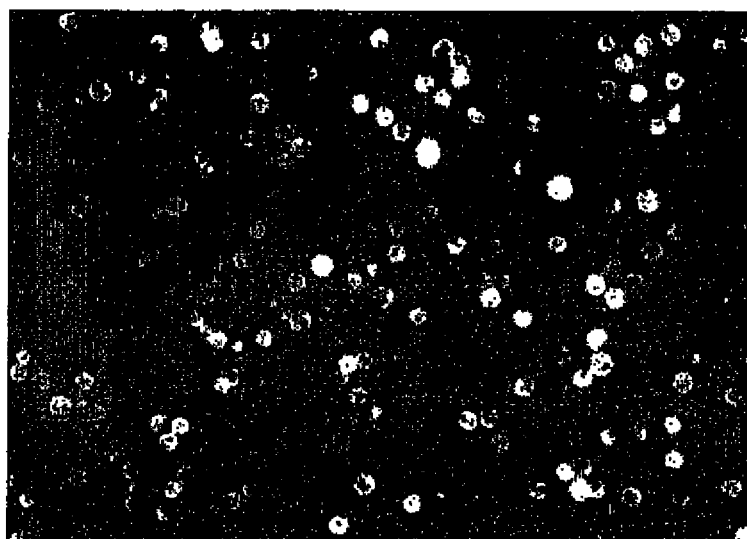
11.

30 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-10, hvori den farmasøytiske sammensetningen eller antistoff er til administrering i ukentlig 375 mg/m² infusjon i en periode på omtrent fire uker.

12.

35 Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 1 eller 3-10, hvori den farmasøytiske sammensetningen eller antistoff er til intravenøs administrering i to doser på omtrent 375 mg/m² ukentlig.

1/13

**FIG.1**

2/13

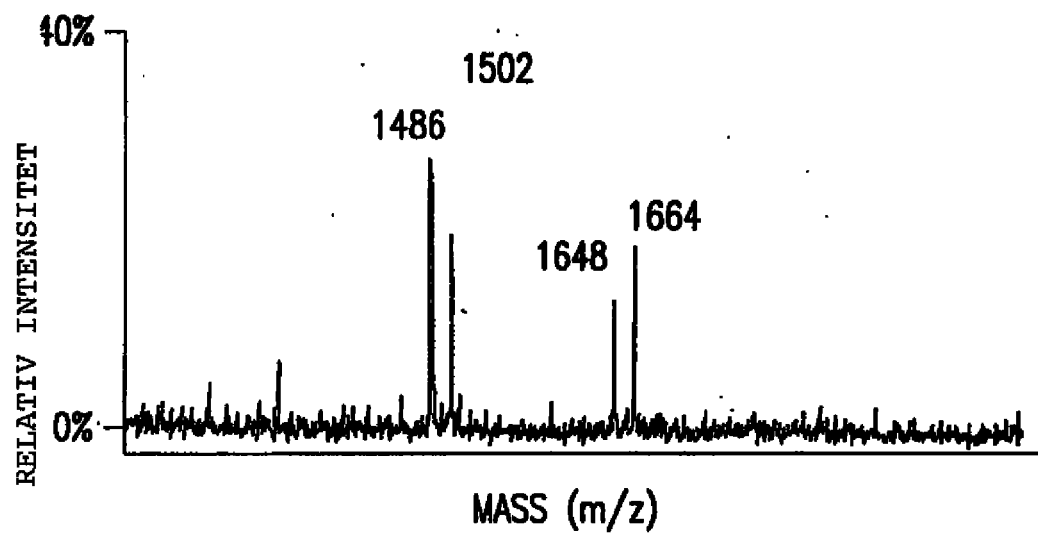


FIG.2A

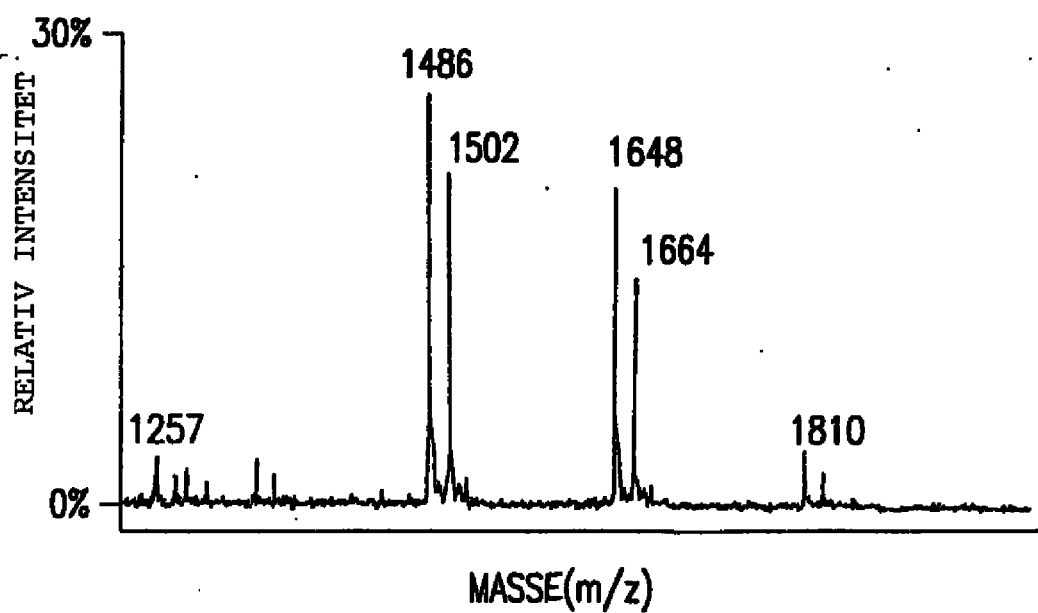


FIG.2B

3/13

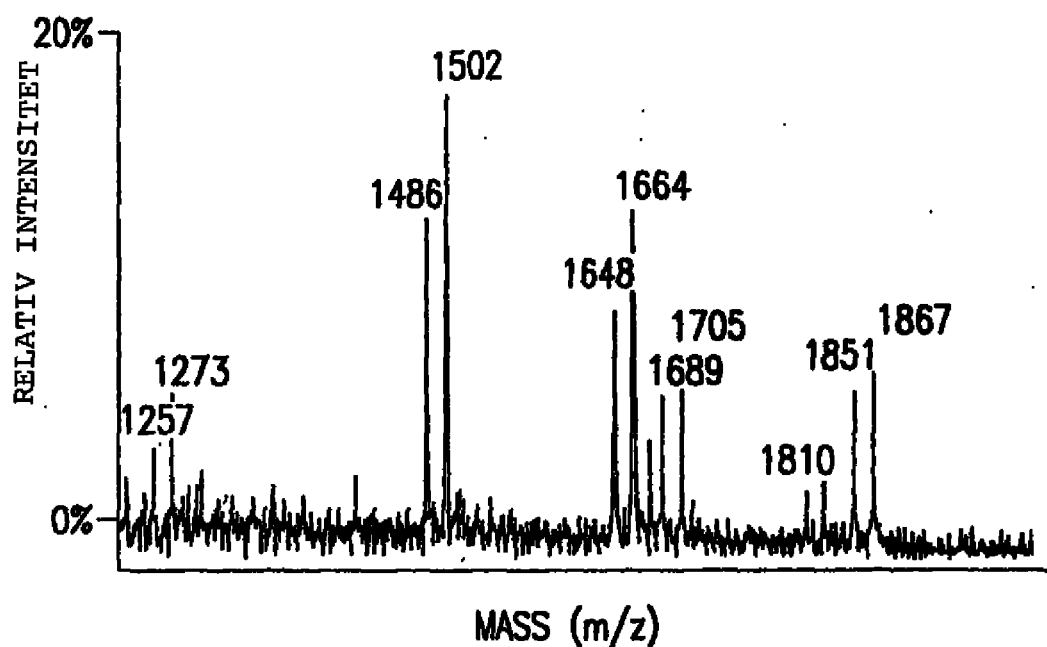


FIG.2C

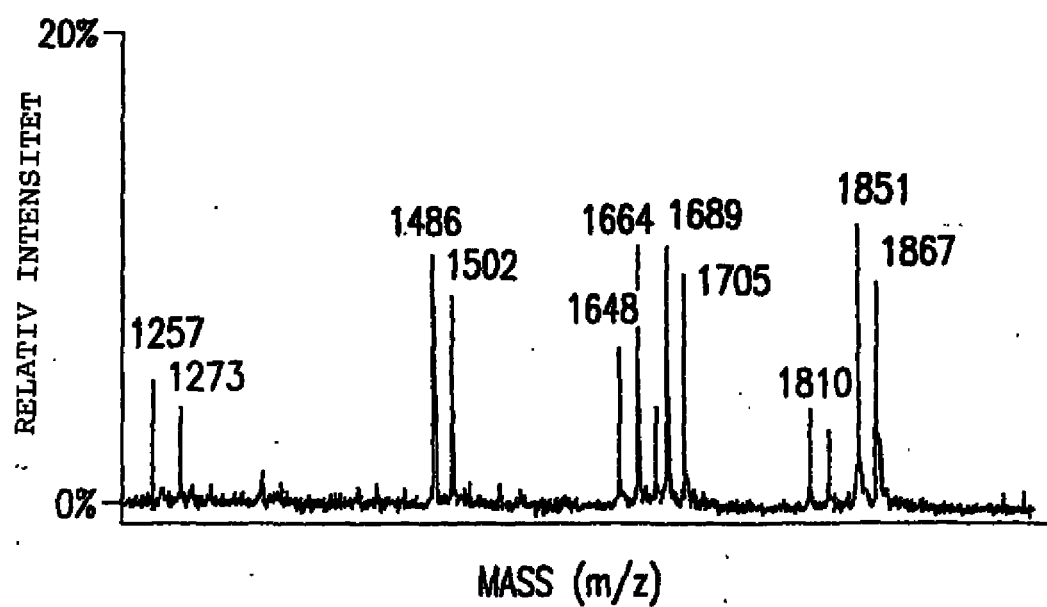


FIG.2D

4/13

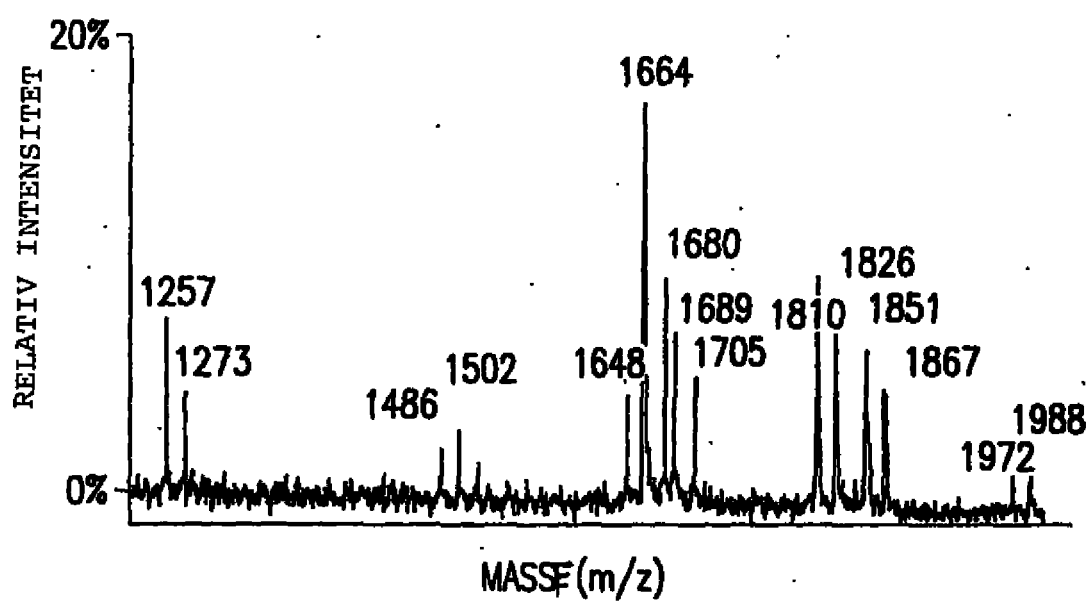


FIG.2E

5/13

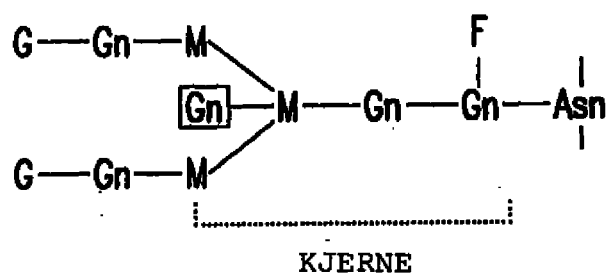


FIG.3A

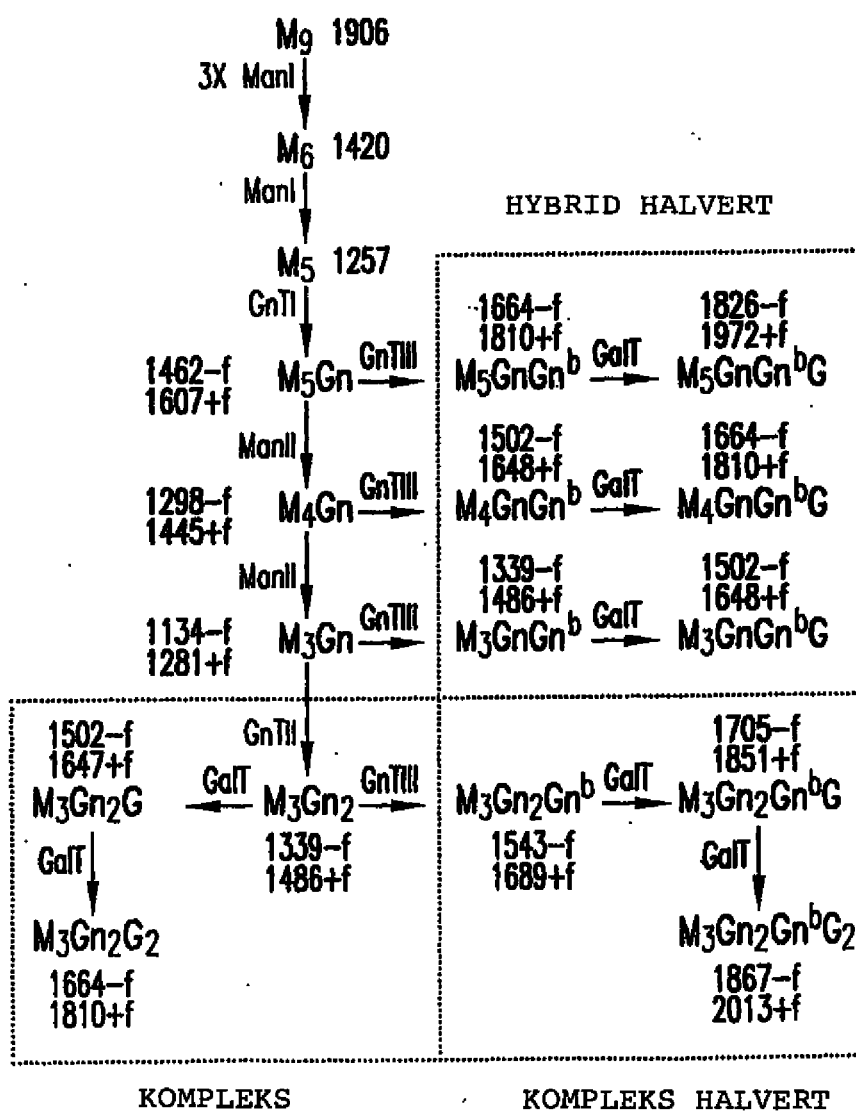


FIG.3B

6/13

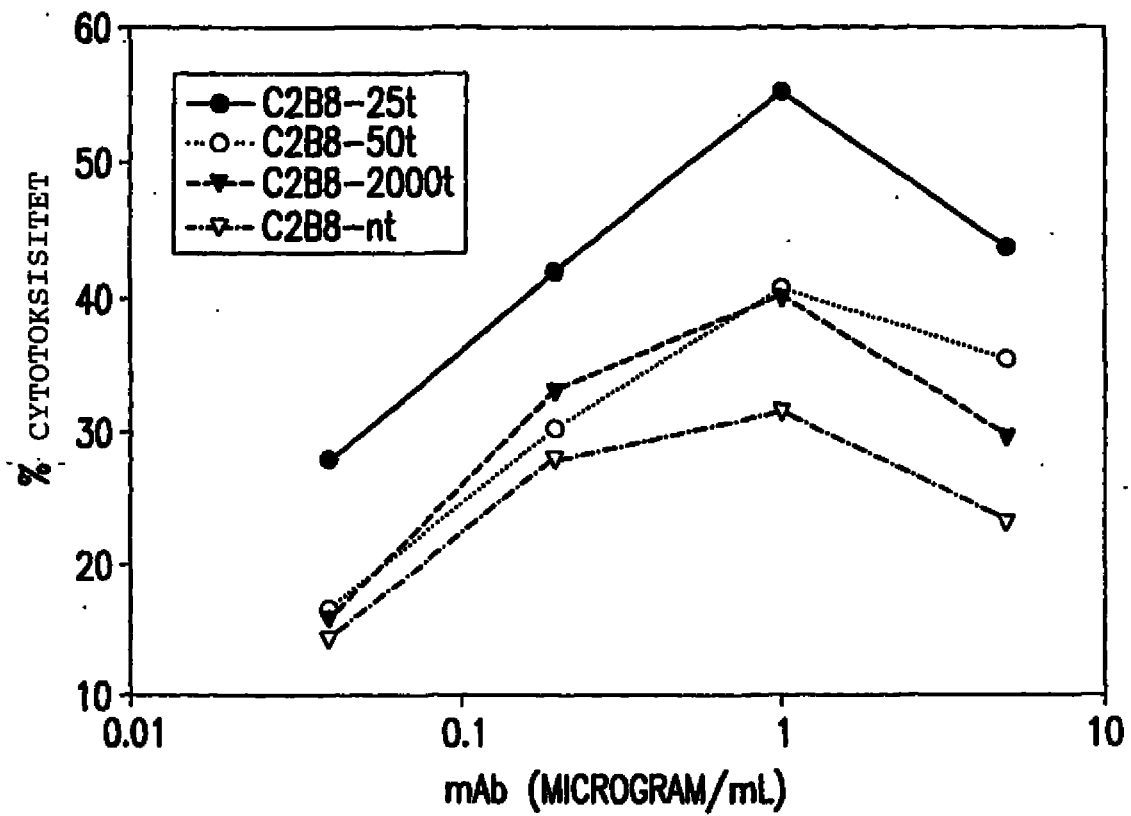


FIG. 4A

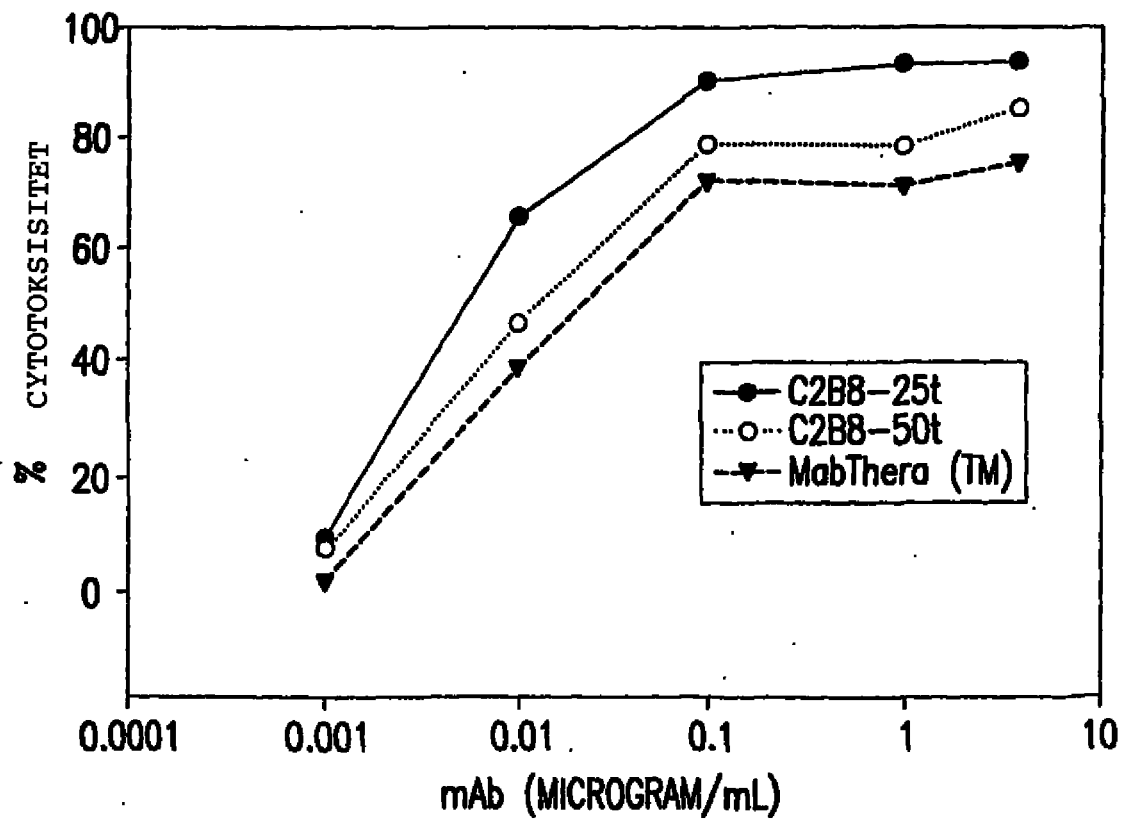


FIG. 4B

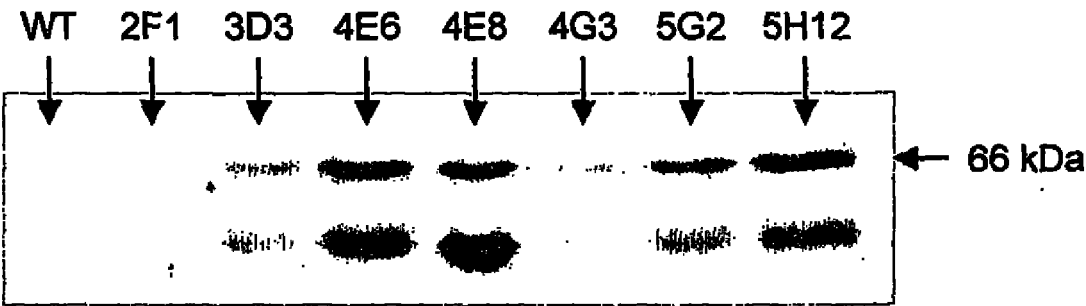


FIG.5

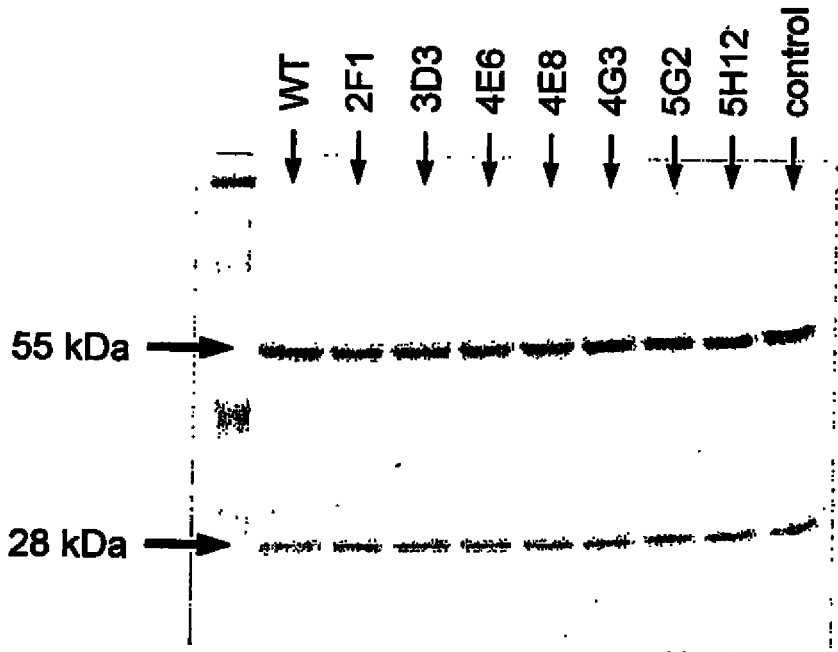
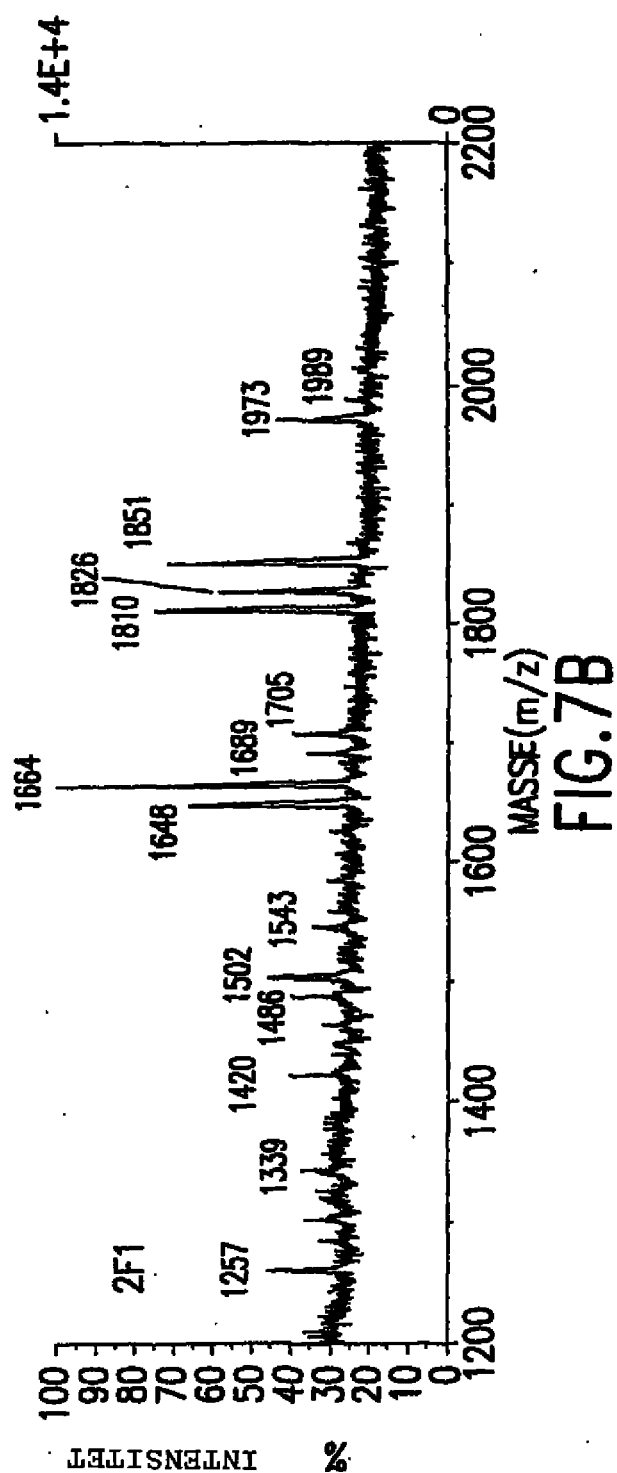
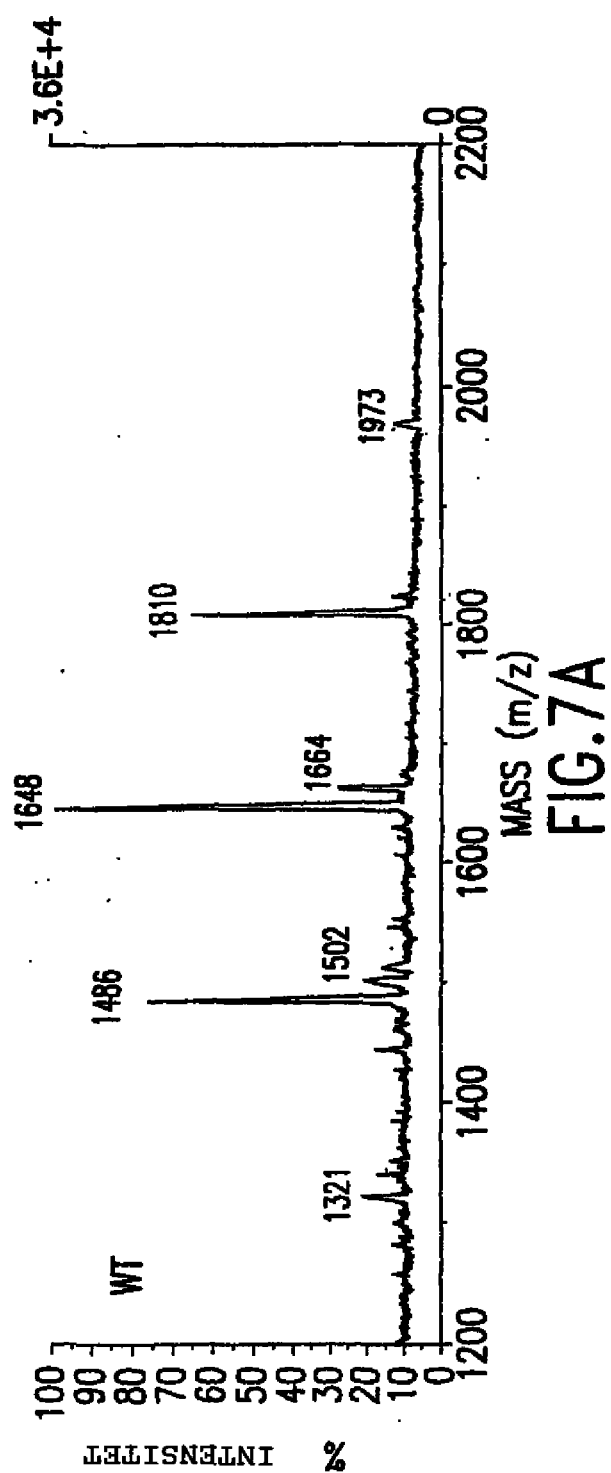
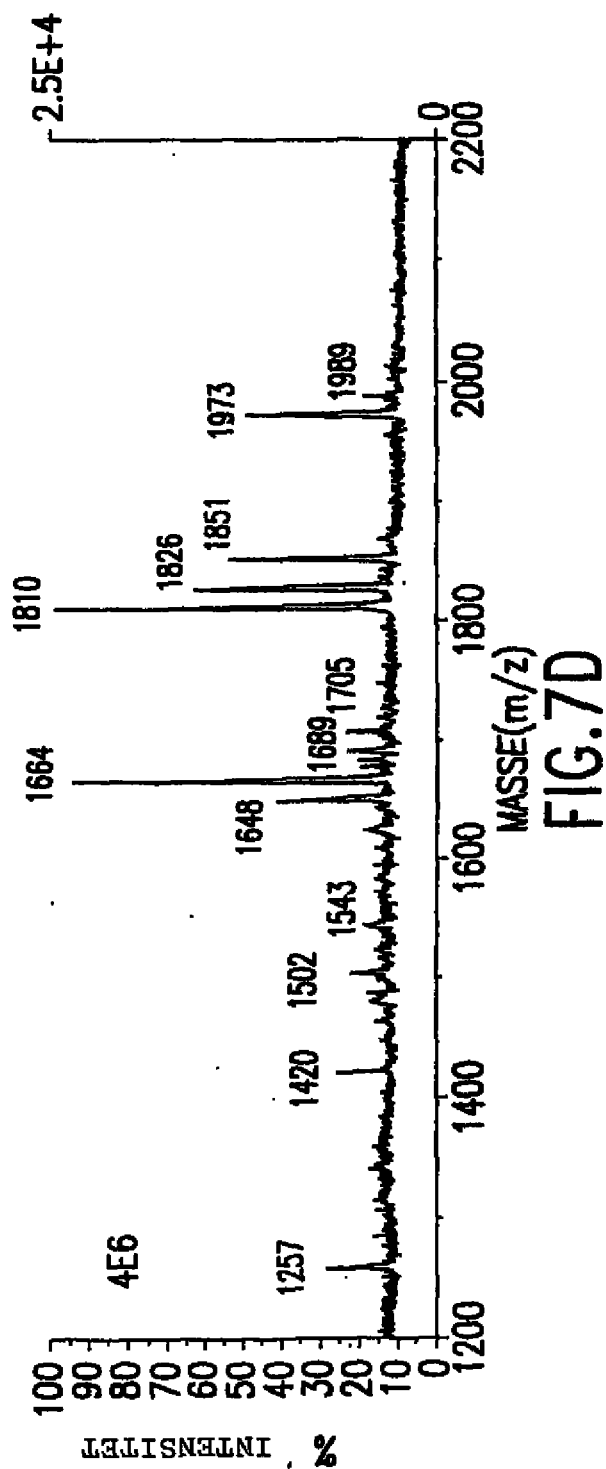
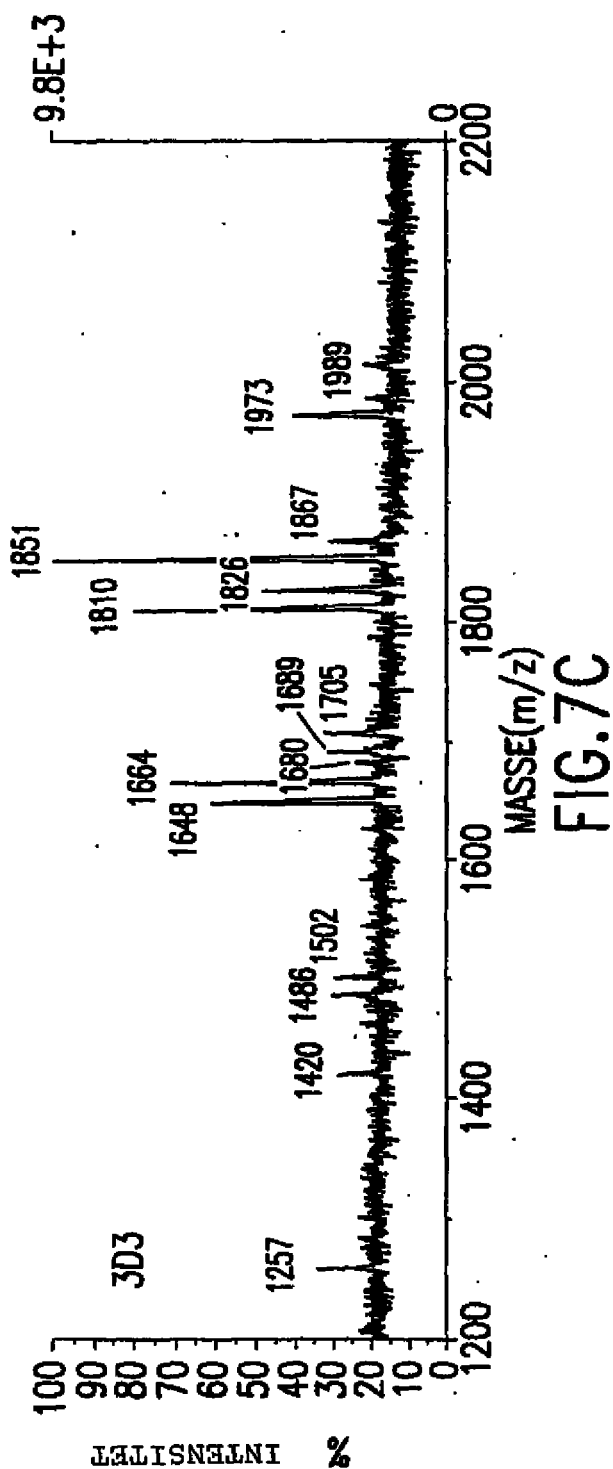


FIG.6

9/13



10/13



11/13

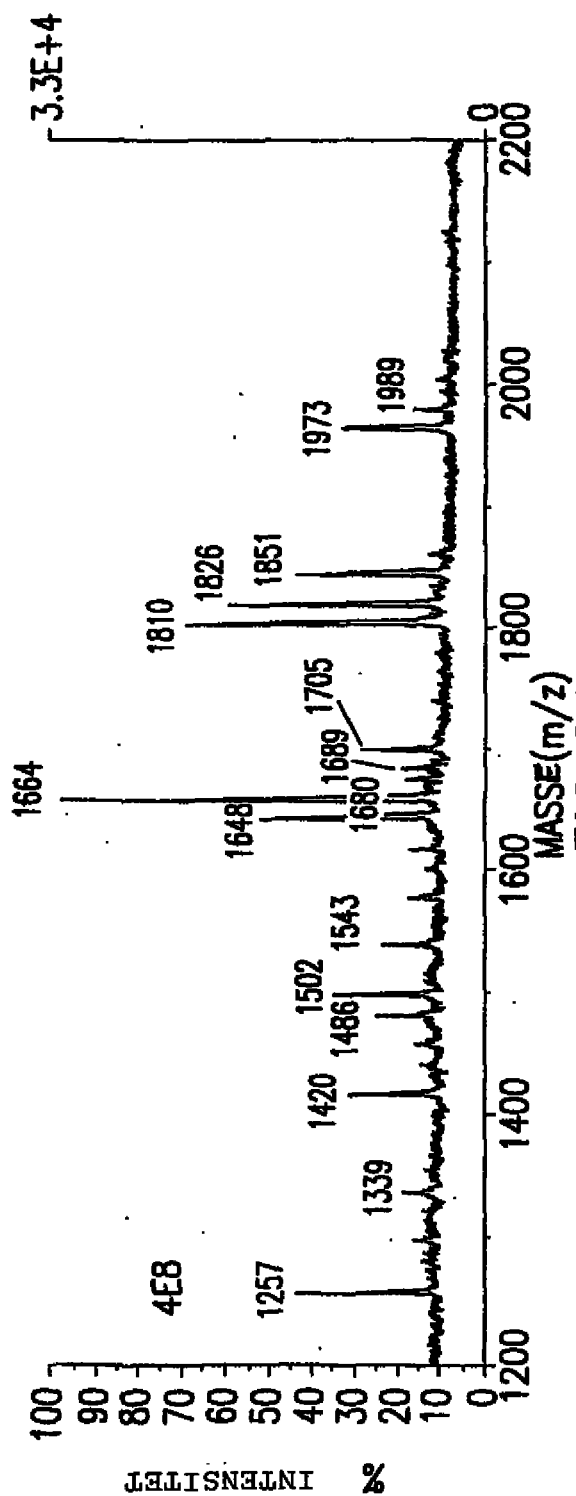


FIG.8A

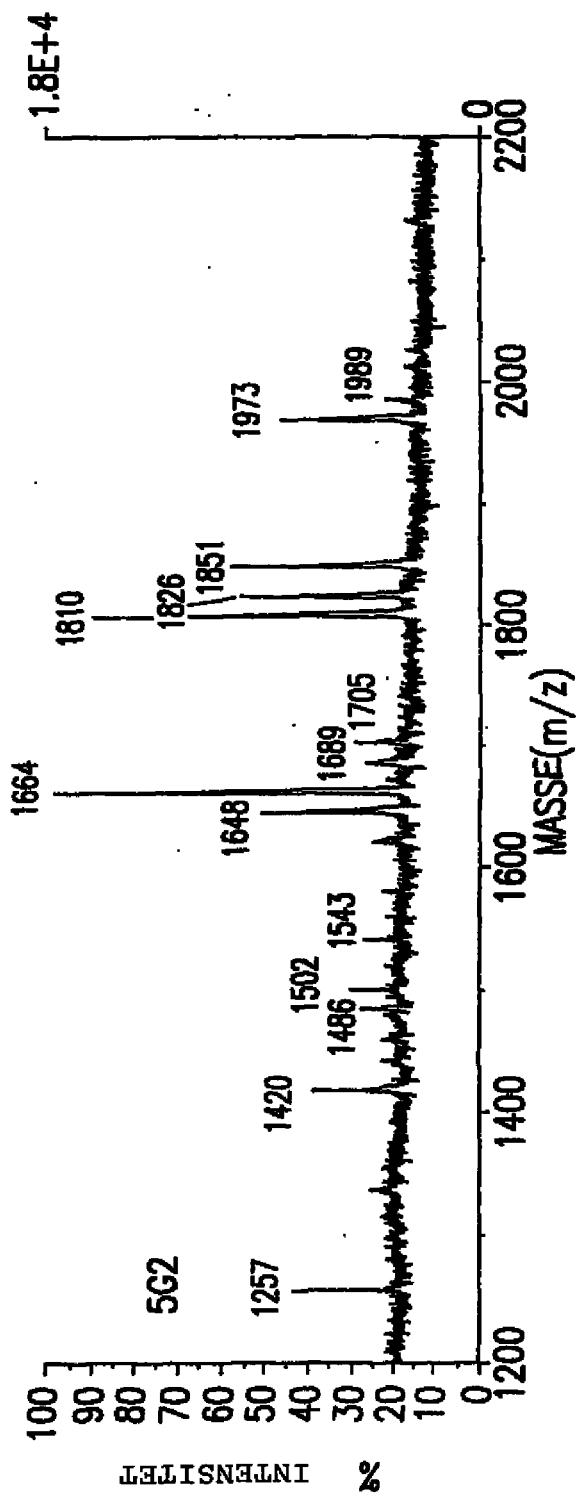
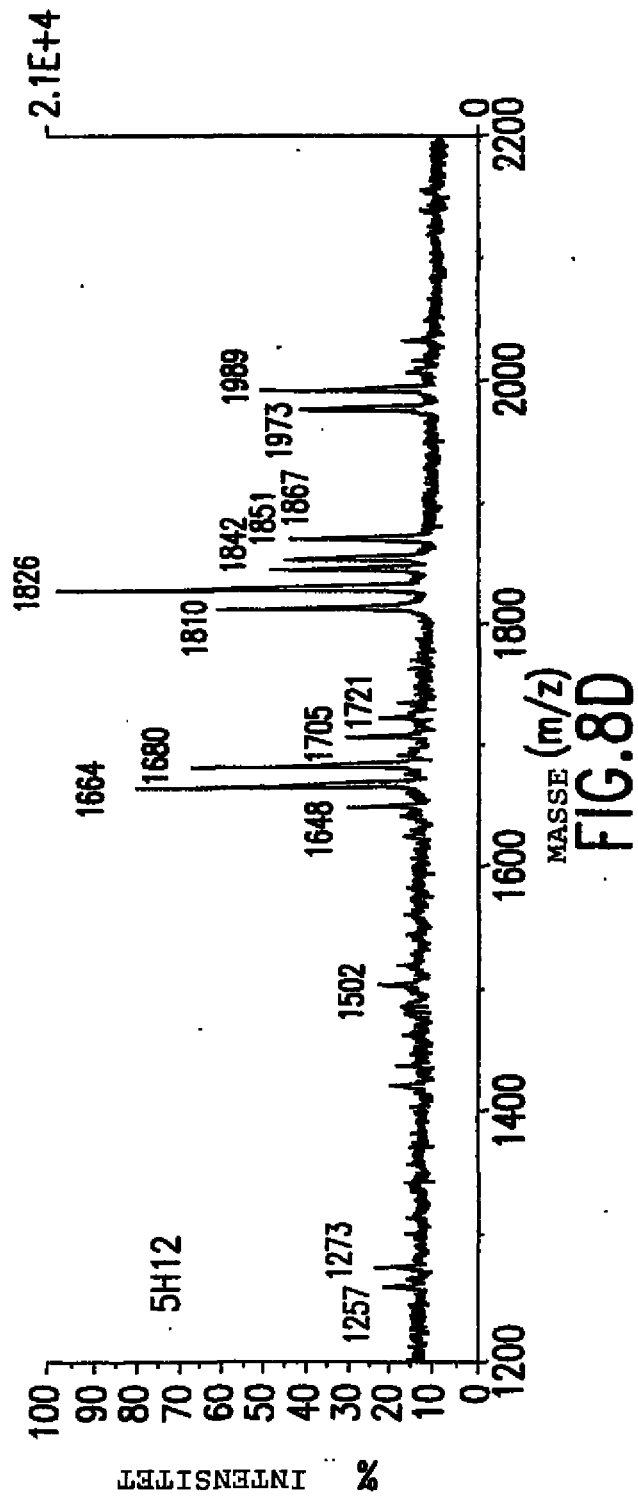
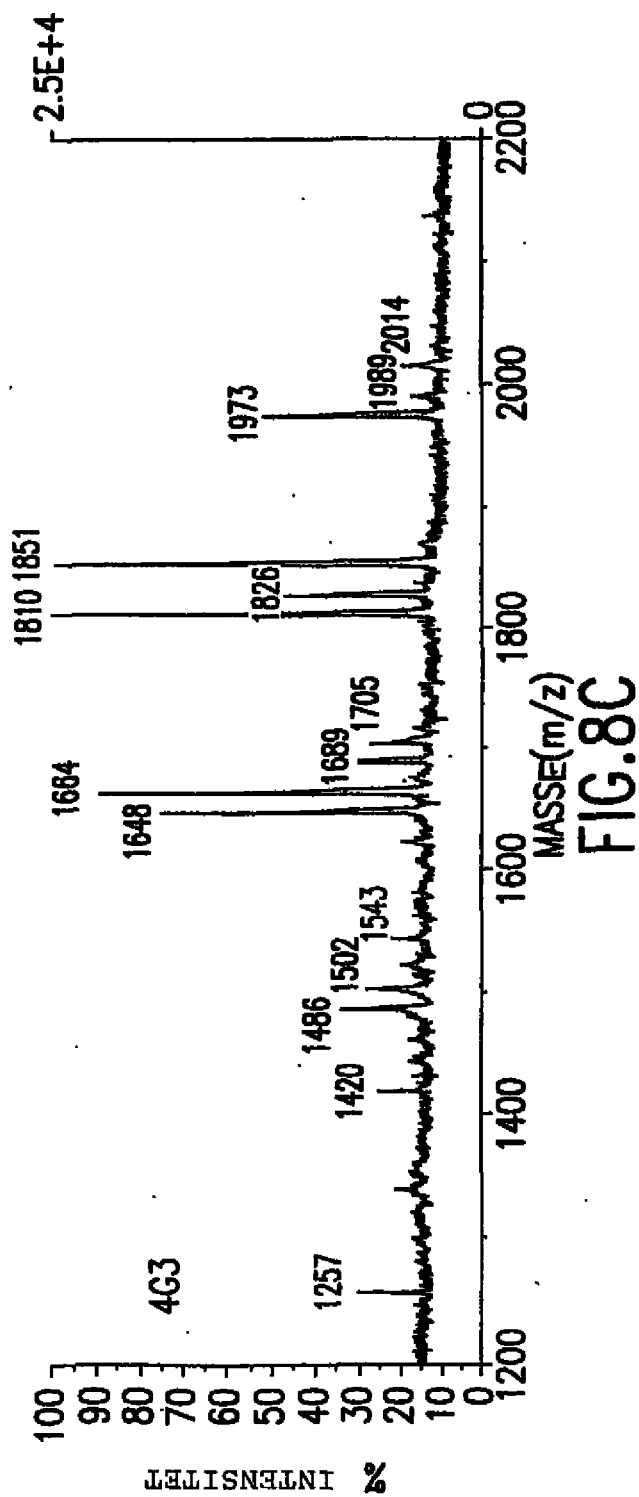


FIG.8B

12/13



IN VITRO ADCC-AKTIVITET AV NYTT KONSTRUERT
chG250 mAb

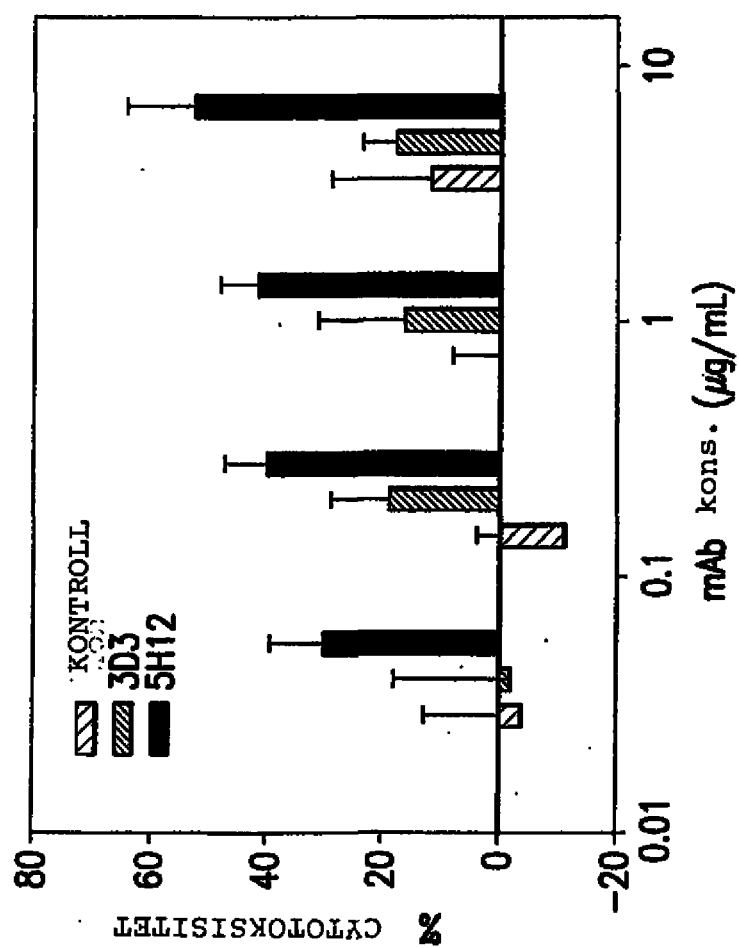


FIG.9