



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720861-8 A2



(22) Data de Depósito: 26/12/2007

(43) Data da Publicação: 25/02/2014

(RPI 2251)

(51) Int.Cl.:

C12P 1/00

C12N 9/00

C12N 9/24

C12N 1/20

C07K 1/00

C07K 16/00

C07H 21/04

(54) Título: MÉTODOS E VETORES PARA GERAR
IMUNOGLOBULINAS ASIALILADAS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 28/12/2006 US 60/882,301

(66) Prioridade Interna: 860446

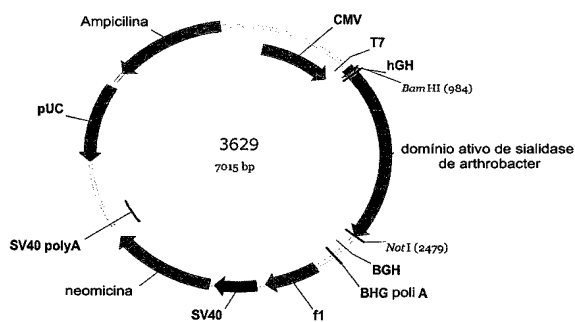
(73) Titular(es): Centocor Ortho Biotech Inc.

(72) Inventor(es): Bernard Scallon, Michael Naso, Susan Tam, T,
Shantha Raju

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088809 de
26/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/083150 de
10/07/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS E VETORES PARA GERAR IMUNOGLOBULINAS ASIALILADAS**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

5 A invenção refere-se a métodos de produzir proteínas terapêuticas que interagem com Receptores Fc, por exemplo, anticorpos, em que a composição das cadeias de oligossacarídeo é otimizada para avidéz do anti-
corpo para seu alvo bem como o receptor Fc ligante afinidade desse modo
10 otimizando a atividade de função efetiva dos anticorpos quando comparado a métodos não otimizados de produzir anticorpos glicosilados.

Descrição da Técnica Relacionada

Anticorpos são glicoproteínas de soro solúvel que tem um papel
significante em imunidade inata. As estruturas de carbono de todos os anti-
corpos produzidos naturalmente em posições conservadas nas regiões
15 constantes de cadeia pesada variam com o isótipo. Cada isótipo processad
um arranjo distinto de estruturas de oligossacarídeo ligadas por N, que vari-
avelmente afetam montagem de proteína, secreção ou atividade funcional
(Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). Com refe-
rência às figuras 1 & 2, a estrutura dos oligossacarídeos ligados por N ane-
20 xados variam consideravelmente, dependendo do grau de processamento, e
pode incluir manose elevada, bem como oligossacarídeos biantenários com-
plexos com ou sem GlcNAc bisseção e resíduos de fucose núcleo (Wright,
A., e Morrison, S. L., supra). Tipicamente, existe o processamento heterogê-
nio das estruturas de oligossacarídeos núcleo anexadas a um sítio de glico-
25 silação particular tal que mesmo anticorpos monoclonais existem como múl-
tiplas glicoformas. Da mesma forma, foi mostrado que maiores diferenças
em glicosilação de anticorpo ocorrem entre linhagens de célula de produção
de anticorpo, e mesmo as menores diferenças são vistas para uma dada
linhagem de célula crescida sob diferentes condições de cultura.

30 Ácido siálico em glicanos (grupos estáticos) são conhecidos co-
mo sendo importantes em prolongar a meia-vida do soro de glicoproteínas
do que outros anticorpos (Stockert, R. J. (1995) *Physiol. Rev.* 75, 591-609).

Assim, o papel do ácido siálico em anticorpos monoclonais (mabs) não é bem compreendido. A meia-vida do soro de Mabs é particularmente longa e a construção de proteínas de fusão Fc provou uma estratégia útil no desenvolvimento de proteínas terapêuticas, por exemplo, a proteína entercept.

5 Anticorpos e regiões que possuem moléculas de receptor de célula T que são responsáveis pela ligação de receptor de superfície de célula específica, tal ligação modula a resposta celular. No sistema imune, essas funções são classificadas como humorais e celulares. Anticorpos são frequentemente referidos como moléculas adaptadoras ligante mecanismos
10 imunes humorais e celulares: respostas humorais sendo atribuídas principalmente a anticorpos maduros, secretados e de circulação capazes de alta ligação de afinidade com um antígeno-alvo. Respostas celulares são atribuídas às consequências de ativação celular por ligação de complexos ab-ag e por sequelas a jusante causadas pela liberação de mediadores celulares
15 como um resultado de ligação de complexo ab-ag a células efectoras. Essas respostas celulares incluem neutralização de alvo, opsonização e sensibilização (se o antígeno for exibido na superfície de uma célula), sensibilização a mastócitos, e ativação de complemento. Para alvos celulares, isto é, antígenos de superfície celular, essas funções efectoras levam ao que é comumente conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e
20 citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

Entre isótipos de anticorpo (por exemplo, IgE, IgD, IgA, IgM, e IgG), IgGs são os mais abundantes com as subclasses IgG1 exibindo o grau mais significativo e arranjo de funções efectoras. Anticorpos do tipo IgG1 são
25 os anticorpos mais comumente usados em imunoterapia de câncer onde atividade ADCC e CDC são frequentemente consideradas importantes. Estruturalmente, a região de charneira IgG e domínios CH2 tem um maior papel nas funções efectoras de anticorpo. Os oligossacarídeos ligados por N presentes na região Fc (formados pela dimerização da charneira, domínios
30 CH2 e CH3) afetam as funções efectoras. Os oligossacarídeos covalentemente ligados são estruturas tipo biantenárias complexas e são altamente heterogêneas (ver figuras 1 e 2). Um sítio de glicosilação ligado por N conservado

em Asn297 permanece em cada domínio CH2. No anticorpo maduro, os dois oligossacarídeos biantenários complexos anexados a Asn297 são colocados entre os domínios CH2, formando contatos extensivos com a estrutura principal do polipeptídeo. Foi descoberto que sua presença é essencial para o anticorpo mediar funções efectoras, tais como ADCC (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *supra*).

Os oligossacarídeos heterogêneos ornamentando o anticorpo de porção Fc ou estruturas derivadas de anticorpo compreendidas produzidos por várias células hospedeira contêm predominantemente ácido siálico, fucose, galactose e resíduos GlcNAc como açúcares terminais (Raju, T.S., et al. *Glycobiology* 2000. 10(5): 477-86). Foi mostrado que alguns desses açúcares terminais, particularmente galactose exposta, fucose núcleo e resíduos GlcNAc de bisseção, afetam a estrutura da porção Fc da molécula e desse modo altera funções efectoras de anticorpo. As funções efectoras tais como atividade ADCC e atividade CDC que permanecem na ligação a receptores de superfície celular conhecidos como receptores Fc, bem como a ligação a vários ligantes incluindo proteína de complemento C1q podem ser alteradas pela composição do glicano anexo (Presta L. 2003. *Curr Opin Struct Biol.* 13(4):519-25). A maioria dos glicanos ligados por N no Fc não são sialilados a uma extensão significativa (Idusogie EE, et al. 2000. *J Immunol.* 15:164(8):4178-84).

As maiores estruturas encontradas em IgG humano e outros IgGs produzidos recombinantemente são estruturas biantenárias complexas com ou sem resíduos Gal (figura 1). Existem várias células hospedeiro de mamíferos que são atualmente usadas para expressar anticorpos recombinantes para finalidades de pesquisa, bem como, produção biofarmacêutica. Espécies de células hospedeira de origem bem como condições de cultura podem causar extensão, e a estrutura de glicandos anexados a moléculas recombinantemente expressas varia. Duas linhagens de célula hospedeira comumente usadas para a expressão recombinante de anticorpos células ovarianas de hamster chinês (CHO) e células de mieloma de camundongo

(sp2/0, 653, NS0). Enquanto células CHO expressam anticorpos recombinantes que são virtualmente desprovidos de glicano de ácido siálico glicanos são 99% fucosilados. A presença de fucose mostrou se a maior contribuidora para receptor Fc-gama III e portanto, ADCC. Células de mieloma de camundongo expressam anticorpos recombinantes até 50% de ácido siálico, mas geralmente com menos fucose. Como declarado acima, essas diferenças podem ter efeitos significantes na atividade do anticorpo *in vivo*.

Portanto, seria desejável ser capaz de reduzir sialilação de glicano associado a anticorpos terapêuticos em uma maneira que elimina a necessidade de processamento após coleta e ao mesmo tempo prover uma estrutura razoavelmente homogenia com relação ao conteúdo de ácido siálico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende métodos, linhagens de célula hospedeira, e vetores de expressão e plasmídeos úteis para produzir moléculas contendo Fc, particularmente terapêuticos de anticorpo, com conteúdo de ácido siálico reduzido. Mais particularmente, a invenção compreende um plasmídeo de expressão codificando uma sequência de codificação de sialidade construída, tal plasmídeo uma vez incorporado em uma linhagem de célula hospedeira de secreção de anticorpo, faz com que a célula hospedeira seja capaz de secretar um polipeptídeo tendo atividade sialidase. Em uma modalidade, a sequência de codificação dentro do plasmídeo codifica o domínio catalítico da sialidase *Arthrobacter ureafaciens*. Em um aspecto adicional da invenção, a célula hospedeira compreendendo o domínio catalítico da sialidase *Arthrobacter ureafaciens* secreta o domínio catalítico traduzido para o meio de cultura.

A presente invenção compreende um método para controlar as propriedades de uma molécula contendo Fc, compreendendo minimizar sialilação dos oligossacarídeos anexados à região Fc desse modo a atividade da molécula para multiplicar proteínas-alvo localizadas e a afinidade para um ou mais dos receptores gama Fc, por exemplo, receptores FcγRI, FcγRIIA, e FcγRIIIA; atividade ADCC; ativação de macrófago ou monócito; e meia-vida

de soro são otimizados.

A invenção também refere-se à preparação de bateladas altamente homogêneas de molécula contendo Fcs, tais como anticorpos, contendo oligossacarídeos ligados por N sialilados ao máximo no domínio Fc. Ela adicionalmente refere-se a purificação de bateladas de anticorpos enriquecidos por anticorpos que contêm ácido siálico no oligossacarídeo Fc.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISTAS DOS DESENHOS

Figura 1 é uma apresentação esquemática da maior estrutura de oligossacarídeo encontrada em IgG humano.

Figura 2 apresenta a maior estrutura de oligossacarídeo encontrada em IgG recombinante em células ovarianas de hamster chinês (CHO).

Figura 3 mostra os resultados de uma análise HPLC de oligossacarídeos Fc. Os oligossacarídeos ligados por N foram primeiramente liberados do anticorpo tratando com enzima PNGase F. Os oligossacarídeos liberados foram rotulados com ácido antranílico e os oligossacarídeos rotulados foram unificados por cromatografia de filtração em gel. Os oligossacarídeos rotulados purificados foram analisados por HPLC, resultando no cromatograma mostrado.

Figuras 4A e 4B são gráficos mostrando a ligação de Ab1 diferente: complexos imunes de TNF a Fc γ RII humanos em células K562 por diferentes formatos. (A) ligação de competição medida adicionando quantidades variadas de complexos não rotulados de Ab1 e TNF a células na presença de uma quantidade fixa de IgG1 humano rotulado em ^{125} I Ab5 complexado com Ab6, um Ab monoclonal de camundongo específico para Ab5. (B) ligação direta medida adicionando à células the K562 variando quantidades de Ab1 complexado com TNF rotulado em ^{125} I.

Figuras 5A-D são gráficos de Fc γ RIIIa ligante estudos com várias preparações Ab de teste usadas para competir anti-Fc γ RIIIa mAb 3G8 radorrotulados em uma concentração fixa para ligar as células NK Fc γ RIIIa: variantes de glicosilação natural Ab1 (A); variantes de glicosilação natural Ab5 (B); frações de coluna de lecitina Ab1 (C); e frações de coluna de lectina Ab2 (D).

Figuras 6A-D são gráficos mostrando resultados de ensaios ADCC *in vitro* realizados usando Ab1 que difere em conteúdo de ácido siálico, células-alvos K2 que sobre-expressam TNF em sua superfície celular, e células efectoras PBMC humanas que expressam FcγRs. (A) variantes de glicosilação natural Ab1, (B) variantes de glicosilação natural Ab2, (C) comparação de três sublotes de Ab1 que diferem em conteúdo de ácido siálico seguindo fracionamento com base em afinidade de lectina WGA, e Ab1 enzimaticamente desglicosilado (Gno), (D) comparação de uma amostra Ab1 não tratada e uma amostras Ab1 G2S2 completamente sialilada, ou controle Ab negativo combinado com isótipo Ab7. Amostras foram analisadas em triplicata (barras de erro representam s.d.) e os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes para cada par de variantes. A diferença na atividade entre essas amostras de teste foi significativa ($P < 0,0001$ para os gráficos A, C, e D; $P = 0,0016$ para o gráfico B) conforme determinado pela soma extra de teste F ao quadrado.

Figuras 7A e B são gráficos mostrando a ligação competitiva de várias amostras de anticorpos IgG para receptor FcγRI (CD64) humano em células U-937 (A) Ab1 G2 (completamente galactosilado e não sialilado) e Ab1 G2S2(hi) (completamente galactosilado e completamente sialilado) diferem apenas pela ausência ou presença de ácido siálico, (B) dois diferentes lotes de Ab3 diferem na quantidade de espécies de oligossacarídeo carregadas (espécies contendo ácido siálico), sendo ou 2% ou 42% do oligossacarídeo total.

Figura 8 é um gráfico mostrando a relação entre o tempo após a administração e a concentração de soro da porção Fc de uma proteína de fusão (cP1) que foi completamente sialilada (G2S2) ou não modificada.

Figura 9 é um gráfico mostrando a relação entre o tempo após a administração e a concentração de soro da porção Fc de de uma, Ab2 G2S2, completamente sialilada, ou Ab2 G2, completamente não sialilada, por métodos enzimáticos como descrito.

Figura 10A-D são gráficos mostrando o efeito de ácido siálico em preparações Ab em afinidade para ligante alvo na superfície celular por

ligação competitiva com Ab radiorrotulado: (A) variantes naturais Ab1, (b) variantes naturais Ab5, (C) variantes de fração de coluna de lectina Ab1, e (D) variantes de fração de coluna de lectina Ab2. Amostras foram testadas em duplicatas ou quadriplicatas, e resultados mostrados são representativos de 3 ou 4 experimentos independentes. A diferença na ligação entre essas amostras de teste foi significativa ($P < 0,0001$ para os gráficos A, C, e D) como determinado pela soma extra de teste F ao quadrado.

Figura 11A-B são gráficos mostrando o efeito de ácido siálico em preparações Ab em afinidade para ligante alvo revestidos em placas EIA: (A) ligação de variantes naturais Ab1 a TNF, (B) ligação Ab2 a um anticorpo anti-Id.

Figura 12A-C são gráficos mostrando o efeito de ácido siálico em preparações Ab em afinidade para ligante alvo apresentado como antígeno solúvel radiorrotulado para uma superfície ligada Ab: (A) variantes naturais Ab1, (B) variantes de fração de coluna de lectina Ab1 1, e (C) variantes de fração de coluna de lectina Ab2. Incubações paralelas com Ag radiorrotulado e Ag não rotulado de 100 vezes em excesso foram feitas para determinar ligações não específicas. Amostras foram testadas em triplicata.

Figura 13 é uma representação esquemática de plasmídeo de expressão p3629 construído para expressar o domínio catalítico da sialidase *Arthrobacter ureafaciens* A ligada a sequência de sinal hGH (hormônio de crescimento humano) com sítios de enzima de restrição usados para clonar no vetor original, p2815, indicado.

Figura 14 é uma representação esquemática de atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de anticorpo purificado a partir da linhagem de células expressando domínio catalítico de sialidase secretada; Clones 3, 5, 12, 13, e 17.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Abreviações

α 1,3GT, α -1,3-galactosiltransferase; α 2,3ST, α -2,3-sialiltransferase; β 1,4GT, β -1,4-galactosiltransferase; ADCC, citotoxicidade celular dependente de anticorpo; ATCC, Coleta de cultura tipo americana; BATDA,

bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-y,y"-dicarboxilato; BSA, albumina de soro bovino; meio CD, meio de cultura definido quimicamente; CDC, citotoxicidade direcionada a complemento; CMP-Sia, ácido N-acetilneuramínico de monofosfato de citidina; DMEM, meios de Eagle modificado por Dulbecco; E:T, relação célula efetora para célula-alvo: FBS, soro bovino fetal; ESI-MS, espectrometria de massa por ionização de eletroaspersão. Células NK, células assassinas naturais; IgG, imunoglobulina G; IMDM, meio de Dulbecco modificado por Iscove; MALDI-TOF-MS, espectrometria de massa de tempo de voo por ionização por dessorção/laser assistido por matriz; MHX, ácido micofenólico, hipoxantina, xantina.; NANA, Isômero de ácido N-acetilneuramínico de ácido siálico; NGNA, Isômero de ácido N-glicolilneuramínico de ácido siálico; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PBMC, célula mononuclear de sangue periférico; PBS, salina de tampão de fosfato; PNGase F, Nglicosidase F de peptídeo; RP-HPLC, cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa; RT, temperatura ambiente; Sia, ácido siálico; UDP-Gal, difosfato galactose de uridina; UDP-GlcNAc, difosfato N-acetilglucosamina de uridina.

Definições

O termo "atividade ADCC" serve para citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo e significa o fenômeno de desnutrição de célula-alvo mediada por anticorpo por células efetoras não sensibilizada. A identidade da célula-alvo varia, mas deve ter sido ligada à imunoglobulina G de superfície tendo um domínio Fc ou porção de domínio Fc capaz de ativação de receptor Fc. A célula efetora é uma célula "assassina" processando receptores Fc. Ela pode ser, por exemplo, um linfócito com falta de marcadores B ou T convencionais, ou um monócito, macrófago, ou leucócito polinuclear, dependendo da identidade da célula-alvo. A reação é independente de complemento. A atividade ADCC de um anticorpo ou outra proteína contendo Fc da presente invenção é "melhorada" se sua capacidade para demonstrar célula assassina mediada por ADCC superar a capacidade de um anticorpo ou proteína de sequência substancialmente similar e domínio Fc produzido por uma célula hospedeira alternativa. A atividade ADCC pode ser

determinada em um padrão de ensaio *in vivo* ou *in vitro* de célula assassina, tal como os ensaios discutidos aqui. Preferivelmente, o anticorpo da invenção tendo atividade ADCC melhorada alcançar o mesmo efeito (prevenção ou inibição de crescimento celular tumoral) em uma dose inferior e/ou em um tempo mais curto do que um anticorpo de referência produzido em uma célula hospedeira alternativa. Preferivelmente, a diferença entre a potência de um anticorpo dentro do escopo da presente invenção e um anticorpo de referência é pelo menos cerca de 1,5 vez, mais preferivelmente de pelo menos cerca de 2 vezes, ainda mais preferivelmente cerca de 3 vezes, o mais preferível cerca de 5 vezes, como determinado, por exemplo, pela comparação lado a lado em um ensaio ADCC de liberação de cromo padrão selecionado.

O termo "afinidade" como usado aqui pretende ser uma medida da ligação constante de um ligante monovalente simples a seu parceiro de ligação cognato, por exemplo, a ligação de um Fab' a um antígeno ou epítopo. A afinidade pode ser medida de várias maneiras incluindo e medindo em taxas on e off (k_{on} e k_{off} respectivamente) por, por exemplo, ressonância de plasma (BiaCore) e expressa como uma associação geral (K_{ass}) ou constante de dissociação (K_D) onde K_{ass} é k_{on}/k_{off} e K_D é k_{off}/k_{on} . K_D pode ser também medido empiricamente, por exemplo, medindo a concentração na qual a ligação do ligante a um parceiro de ligação é meio saturada. Outro método de medir K_D é por ensaio de competição, no qual um aglutinante ou ligante é rotulado ou etiquetado e mantido em uma concentração constante, enquanto o aglutinante ou ligante de teste é adicionado em concentrações variadas para competir fora da substância rotulada de seu parceiro de ligação cognato e determinar a concentração na qual o rótulo é administrado pela metade.

O termo "avidez" como usado aqui pretende ser uma medida da tendência de um ligante em permanecer ligado a um parceiro cognato insofar assim como ambos o ligante e o parceiro de ligação podem ser multivalentes e a tendência a múltiplos eventos de associações e dissociações pode ocorrer simultaneamente para um ligante específico. Assim, a avidez pode ser medida por um aumento em uma afinidade aparente de conformações multivalentes de um parceiro de ligação com uma afinidade conhecida.

O termo "Proteína contendo Fc" ou "Molécula contendo Fc" como usado aqui refere-se a uma proteína monomérica, dimérica ou heterodimérica tendo um domínio de ligação de ligante e pelo menos um domínio CH2 and CH3 de imunoglobulina. Os domínios CH2 e CH3 podem formar pelo menos uma parte da região dimérica de uma proteína/molécula (por exemplo, anticorpo).

O termo "anticorpo" pretende englobar anticorpos, fragmentos de digestão, porções específicas e variantes dos mesmos, incluindo, sem limitação, miméticas de anticorpo, ou compreendendo porções de anticorpos que imitam a estrutura e/ou função de um anticorpo ou fragmento ou porção específicos do mesmo, e retém funções mediadas por Fc, incluindo, mas não limitadas a: ligação a receptores Fc (por exemplo, Fc γ RI (CD64) Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIIA (CD16A) e FcRn), complemento de ligação (por exemplo, C1q), ADCC e CDC.

O termo "anticorpo monoclonal" como usado aqui é uma forma específica de proteína de fusão contendo Fc em que o domínio de ligação de ligante retém homologia substancial para pelo menos um domínio variável de anticorpo de cadeia pesada ou leve de pelo menos uma espécie de anticorpo animal.

As "funções efetoras" de anticorpos do análogo de anticorpo como é usado aqui são processos pelo qual patógenos ou células anormais, por exemplo, células tumorais, são destruídas e removidas do corpo. Respostas imunes inatas ou adaptativas usam a maioria dos mesmos mecanismos efetores para eliminar patógenos incluindo ADCC, CA (ativação de complemento), ligação de C1q, e opsinização.

Como usado aqui, o termo "célula hospedeira" refere-se a qualquer tipo de sistema celular que pode ser construído para gerar proteínas, fragmentos de proteínas, ou peptídeos de interesse, incluindo anticorpos ou fragmentos de anticorpos. Células hospedeira incluem, sem limitação, células cultivadas, por exemplo, células cultivadas de mamíferos, tais como células CHO, células BHK, células NOS, células SP2/0, células de hibridoma, células de levedura, e células de inserção, mas também células compreen-

didadas dentro de um tecido de animal transgênico ou cultivado.

O termo "ácido siálico" refere-se a qualquer membro da família de açúcares carboxilados de nove carbonos. O membro mais comum da família do ácido é siálico é ácido N-acetil neuramínico (ácido 1 2-ceto-5-acetamido-3,5-dideóxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ônico (frequentemente abreviado como Neu5Ac, NeuAc, ou NANA). Um segundo membro da família é ácido N-glicolil-neuramínico (NGNA, Neu5Gc ou NeuGc), em que o grupo N-aceti de NeuAc é hidroxilado. Esta forma prevalece em glicoproteínas de roedores e fontes microbianas. Uma terceira família do ácido siálico é ácido 2-ceto-3-deóxi-nonulosônico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Também incluídos estão ácidos siálicos substituídos em 9 tais como 9-O-C-C6 acila Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac ou 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-deóxi-9-fluoro-Neu5Ac e 9 azido-9-deóxi-Neu5Ac. Para revisão da família do ácido estático, ver, por exemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer Verlag, New York (1992)).

Descrição

Ao passo que os presentes inventores inesperadamente descobriram que o nível de sialilação dos oligossacarídeos Fc altera a afinidade de anticorpos terapêuticos produzidos de forma recombinante para receptores Fc γ , resultando em modulação de vários aspectos das ações biológicas dos anticorpos. Mais especificamente, foi descoberto que Abs altamente sialilados tiveram afinidade significativamente reduzida para os receptores de baixa afinidade, Fc γ RIIA (CD32A) e Fc γ RIIIA (CD16A), e tiveram atividade significativamente reduzida em ensaios ADCC *in vitro* em que Fc γ RIIIA acredita-se ser o receptor relevante. Foi adicionalmente descoberto que Abs altamente sialilados tiveram afinidade aumentada para o receptor Fc γ de alta afinidade, Fc γ RI (CD64), e que as proteínas completamente sialiladas contendo Fcs tiveram meia-vida de soro reduzida quando comparadas a proteínas contendo Fc não sialiadas ou parcialmente sialiladas. Foi adicionalmente descoberto que a remoção (ou a ausência ou níveis reduzidos) de ácido siálico dos

Oligossacarídeos Fc melhora a avidéz de anticorpos terapêuticos produzidos de forma recombinante para sua molécula alvo. Essas descobertas e informações de suporte foram descritas no Pedido Provisório U.S. co-pendente N^{os} 60/695,769, 60/809,106, 60/841,153.

5 Enquanto não desejando estar ligado a qualquer teoria, a remoção do grupo estático carregado do oligossacarídeo pode ser interpretada como permitindo mais flexibilidade na estrutura de anticorpo geral, tal flexibilidade confere uma esfera maior de interação potencial para os dois domínios de ligação na relação de um para o outro. A capacidade de um Ab se
10 ligar bivalentemente a dois epítomos de antígeno irá também depender de uma acessibilidade, orientação, densidade e mobilidade. Deve ser notado que o efeito de ligação de antígeno de sialilação pode também ser relevante para Abs que reconhecem antígenos de superfície viral ou bacteriana, e mesmo antígenos que são homopolímeros, uma vez que flexibilidade de Ab
15 pode determinar a quais moléculas Ab individuais estendidas se ligar de forma bivalente dentro de um complexo imune solúvel, onde não apenas alguns dos Abs podem se ligar a mais de um antígeno, mas alguns dos antígenos podem ser ligados por mais de um Ab.

A presente invenção compreende um método para controlar as
20 propriedades de uma molécula contendo Fc alterando a sialilação dos oligossacarídeos Fc e as moléculas contendo Fc alteradas. Espera-se que ácido siálico no carboidrato ligado a Fc altere-se para a estrutura tridimensional e portanto, conformação do domínio CH2 e desse modo afete a ligação Fc para vários ligantes ou receptores. A molécula contendo Fc afeta a afinidade
25 de um ou mais dos receptores FcγRI, FcγRIIA, e FcγRIIIA, atividade ADCC, ativação de macrófago ou monócito, e meia-vida de soro.

Enriquecimento de Formas de Sialilação de Proteína Contendo Fcs

Uma abordagem para preparar sublotos de uma proteína contendo Fc particular difere que difere em ácido siálico é para tomar uma pre-
30 paração de proteína contendo Fc com oligossacarídeos Fc heterogêneos, incluindo ambas as moléculas sialiladas e não sialiladas, e passá-la sobre uma coluna contendo uma lectina imobilizada que tem afinidade diferencial

para oligossacarídeos sialilados e não sialilados. O fluxo-passante de não ligação (T, passante) ou a fração não ligada por coluna podem ser separados da fração ligada (B, ligada), a última coletada enquanto passando tampão de eluição através da coluna. Pode ser também possível coletar separadamente uma fração ligada fracamente ou uma fração retardada ou coluna (R, retardada), por exemplo, coletando proteína contendo Fc que elui durante lavagem continuada da coluna com o tampão de amostra original. Dependendo da lectina usada, a fração de não ligação pode ter um conteúdo de ácido siálico menor do que a fração que se liga.

Exemplos de lectinas que podem enriquecer para proteínas contendo Fc sialiladas ou não sialiladas são a lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que especificamente liga oligossacarídeos a ácido siálico terminal, e a aglutinina de gérmen de trigo de lectina (WGA), que especificamente liga oligossacarídeos com ácido siálico terminal ou N-acetilglucosamina terminal (GlcNAc). Outro exemplo é a Ricina I de lectina (RCA), que liga oligossacarídeos à galactose terminal. No último exemplo, a fração de fluxo passante de não ligação pode ser enriquecida por moléculas contendo Fc sialiladas.

Modificação Enzimática de Proteína Contendo Fcs

Uma abordagem alternativa para preparar sublotos de uma proteína contendo Fc que difere em conteúdo de ácido siálico é tratar uma porção de uma proteína contendo Fc com enzima sialidase, desse modo removendo ácidos siálicos. O material não sialilado resultante pode ser comparado ao material parcialmente assialilado original para diferenças em atividade biológica. Quanto mais alto o conteúdo de ácido siálico mais elevado no lote de proteína contendo Fc original, maiores as chances de detectar quaisquer diferenças na atividade biológica., por exemplo, se apenas 10% dos Oligossacarídeos Fc na preparação de proteína original contve ácido siálico, pode ser difícil detectar diferenças na atividade biológica após tratamento de sialidase, quando 0-1% dos oligossacarídeos contém ácido siálico. Comparando a atividade biológica de uma proteína contendo Fc antes e depois de tratamento de sialidase será difícil se o tratamento de sialidase resultar em uma distribuição diferente de oligossacarídeos fucosilados e afucosilados, uma

vez que níveis de fucose têm um profundo efeito em certas atividades biológicas, tais como FcγRIIIA e atividade ADCC., por exemplo, se uma redução do conteúdo de ácido siálico de 30% dos oligossacarídeos a 0% resulta na proporção de oligossacarídeos afucosilados aumentado de 5% a 15%, então
5 não será possível atribuir diferenças na atividade ADCC somente devido ao aumento no conteúdo de ácido siálico. Tal um efeito de tratamento de sialidase na proporção relativa de oligossacarídeos fucosilados e afucosilados é possível (e tem sido observado) por causa das diferenças na sialilação de oligossacarídeos fucosilados e afucosilados antes do tratamento com sialidase para remover resíduos de ácido siálico.
10

Sialilação de oligossacarídeos presentes na região Fc pode também ser alcançada usando métodos de glicosilação *in vitro*. Usando tais métodos, é possível manter glicoformas sialiladas ao máximo de amostras de anticorpo. Com base na presente descoberta glicoformas sialiladas ao
15 máximo de anticorpos ou outros construtos contendo Fc terão meia-vida de soro reduzida quando comparadas a anticorpos assialilados ou sob-sialilados. Assim, o método da invenção provê meios opcionais para controlar a homogeneidade das glicoformas compreendendo anticorpo ou outros construtos de proteína recombinante contendo uma região Fc de imunoglobulina e os aspectos *in vivo* dos anticorpos ou construtos.
20

Glicosiltransferases naturalmente funcionam para sintetizar oligossacarídeos. Elas produzem produtos específicos com excelente geometria estereoquímica e regioquímica. A transferência de resíduos de glicosila resulta no alongamento ou síntese de um oligo ou polissacarídeo. Vários
25 tipos de glicosiltransferase foram descritos incluindo sialiltransferases, fucosiltransferases, galactosiltransferases, N-acetilgalactosaminiltransferases, N-acetilglucosaminiltransferases e semelhantes.

Glicosiltransferases que são úteis na presente invenção incluem, por exemplo, α -sialiltransferases, α -glucosiltransferases, α -galactosiltransferases, α -fucosiltransferases, α -mannosiltransferases, α -xilosiltransferases, α -N-acetilhexosaminiltransferases, β -sialiltransferases, β -glucosiltransferases, β -galactosiltransferases, β -fucosiltransferases, β -
30

mannosiltransferases, β -xilosiltransferases, e β -N-acetilhexosaminiltransferases, tais como aquelas de *Neisseria meningitidis*, ou outras fontes bacterianas, e aquelas de rato, camundongo, coelho, vaca, porco, humano e inseto, e fontes virais. Preferivelmente a glicosiltransferase é uma enzima de glicosiltransferase de variante de truncamento em que o domínio de ligação de membrana foi deletado.

Galactosiltransferases exemplares incluem $\alpha(1,3)$ galactosiltransferase (E.C. Nº 2.4.1.151, ver, por exemplo, Dabkowski et al., *Transplant Proc.* 25:2921 (1993) e Yamamoto et al. *Nature* 345:229-233 (1990)) e $\alpha(1,4)$ galactosiltransferase (E.C. Nº 2.4.1.38). Outras glicosiltransferases podem ser usadas, tais como uma sialiltransferase. Uma $\alpha(2,3)$ sialiltransferase, frequentemente referidas como a sialiltransferase, podem ser usadas na produção de sialil lactose ou outras estruturas mais elevadas. Esta enzima transfere ácido siálico (NeuAc) do Ácido siálico CPM para um resíduo Gal com a formação de uma ligação dentre os dois sacarídeos. Ligar (ligação) entre os sacarídeos está dentre a posição 2 de NeuAc e a posição 3 de Gal. Uma $\alpha(2,3)$ sialiltransferase exemplar referida como $\alpha(2,3)$ sialiltransferase (EC 2.4.99.6) transfere ácido siálico para um Gal terminal de não redução de um dissacarídeo ou glicosídeo Gal β 1 $\rightarrow$ 3Glc. Ver, Van den Eijnden et al., *J. Biol. Chem.*, 256:3159 (1981), Weinstein et al., *J. Biol. Chem.*, 257:13845 (1982) e Wen et al., *J. Biol. Chem.*, 267:21011 (1992). Outra α -2,3- sialiltransferase exemplar (EC 2.4.99.4) transfere ácido siálico para um Gal terminal de não redução do dissacarídeo ou glicosídeo. Ver, Rearick et al., *J. Biol. Chem.*, 254:4444 (1979) e Gillespie et al., *J. Biol. Chem.*, 267:21004 (1992). Enzimas exemplares adicionais incluem Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferase (Ver, Kurosawa et al. *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

Outras glucosiltransferases particularmente úteis na preparação de oligossacarídeos da invenção são manosiltransferases incluindo $\alpha(1,2)$ manosiltransferase, $\alpha(1,3)$ manosiltransferase, $\beta(1,4)$ manosiltransferase, Dol-P-Man synthase, OCh1, e Pmt1.

Ainda outras glucosiltransferases incluem N-acetilgalactosami-

niltransferases incluindo $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferase, $\beta(1,4)$ N-acetilgalactosaminiltransferases (Nagata et al. J. Biol. Chem. 267:12082-12089 (1992) e Smith et al. J. Biol Chem. 269:15162 (1994)) e N-acetilgalactosaminiltransferase de polipeptídeo (Homa et al. J. Biol Chem. 268:12609 (1993)). N-acetilglucosaminiltransferases adequadas incluem GnTI (2.4.1.101, Hull et al., BBRC 176:608 (1991)), GnTII, e GnTIII (Ihara et al. J. Biolchem. 113:692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al. J. Biol. Chem. 268:15381 (1993)).

Para aquelas modalidades nas quais o método deve ser praticado em uma escala comum, pode ser vantajoso imobilizar a glicosil transferase em um suporte. A imobilização facilita a remoção da enzima da batelada do produto e subsequente reutilização da enzima. A imobilização de glicosil transferase pode ser realizada, por exemplo, removendo da transferase seu domínio de ligação de membrana, e anexando em seu lugar um domínio de ligação de celulose. Um versado na técnica irá compreender que outros métodos de imobilização poderiam ser usados e são descritos na literatura disponíveis.

Devido do acceptor substratos podem ser essencialmente qualquer monossacarídeo ou oligossacarídeo tendo um resíduo de sacarídeo terminal para o qual a glicosil transferase particular exhibe especificidade, o substrato pode ser substituído na posição de sua extremidade de na redução. Assim, o acceptor de glicosídeo pode ser um monossacarídeo, um oligossacarídeo, um sacarídeo rotulado fluorescente, ou um derivado de sacarídeo, tal como um antibiótico aminoglicosídeo, um gangliosídeo ou uma glicoproteína incluindo anticorpos e outras proteínas contendo Fc, em um grupo de modalidades preferidas, o acceptor de glicosídeo é uma oligossacarídeo, preferivelmente, $\text{Gal}\beta(1-3)\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta(1-4)\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta(1-3)\text{GalNAc}$, $\text{Gal}\beta(1-4)\text{GalNAc}$, $\text{Man } \alpha(1,3)\text{Man}$, $\text{Man } \alpha(1,6)\text{Man}$, ou $\text{GalNAc}\beta(1-4)\text{-manose}$. Em uma modalidade preferida particular, o acceptor de oligossacarídeo é anexado ao domínio de uma proteína contendo Fc.

O uso de substrato de açúcar ativado, isto é, fosfato de nucleosídeo de açúcar, pode ser circunventilado ou usando uma reação de regene-

ração simultaneamente com a reação de glicotransferase (também conhecida como um sistema de reciclagem). Por exemplo, como ensinado em Pat U.S. 6,030,815, um sistema de reciclagem de Ácido siálico CPM utiliza sintetase de Ácido siálico CPM para recolocar Ácido siálico CPM (CMP-NeuAc) conforme ele reage com aceptor de sialiltransferase na presença de uma $\alpha(2,3)$ sialiltransferase para formar o sialil-sacarídeo. O sistema de regeneração do ácido siálico CPM útil na invenção compreende monofosfato de cistidina (CMP), um trifosfato de nucleosídeo (por exemplo, trifosfato de adenosina (ATP), um doador de fosfato (por exemplo, fosfoenolpiruvado ou fosfato de acetila), uma quinase (por exemplo, quinase de piruvato ou quinase de acetato) capaz de transferir fosfato do doador de fosfato para difosfatos de nucleosídeo e uma quinase de monofosfato de nucleosídeo (por exemplo, mioquinase) capaz de transferir o fosfato terminal de um trifosfato de nucleosídeo para CMP. A $\alpha(2,3)$ sialiltransferase e sintase de ácido siálico CPM podem também ser vistos como parte do sistema de regeneração do ácido siálico COM como remoção do ácido siálico serve para manter a taxa direta de síntese. A síntese e o uso de compostos de ácido siálico em um procedimento de sialilação usando um fagemídeo compreendendo um gene para uma enzima de síntase de Ácido siálico COM modificado é descrito no pedido internacional WO 92/16640, publicado em 1 de outubro de 1992.

Um método alternativo de preparar oligossacarídeos é através do uso de uma glicosiltransferase e derivados de glicosil ativado como açúcares doadores abreviando a necessidade de nucleotídeos de açúcar com ensinado na Pat. U.S. 5,952,203. Os derivados de glicosil ativados atuam como alternativas para os substratos de ocorrência natural, que são nucleotídeos de açúcar caros, usualmente difosfoaçúcares de nucleotídeo ou monofosfoaçúcares de nucleotídeo em que o fosfato de nucleotídeo é ligado em α a posição 1 do açúcar.

Derivados de glicosídeo ativado que são úteis incluem um grupo de saída ativado, tal como, por exemplo, flúor, cloro, bromo, éster tosilato, éster mesilato, éster triflato, e semelhantes. Modalidades preferidas de deri-

vados de glicosídeo ativado incluem fluoretos de glicosila e mesilatos de glicosila, com fluoretos de glicosila sendo particularmente preferidos. Entre os fluoretos de glicosila, fluoreto de α -galactosila, fluoreto de α -manosila, fluoreto de α -glucosila, fluoreto de α -fucosila, fluoreto de α -xilosila, fluoreto de α -sialila, fluoreto de alfa-N-acetilglucosaminila, fluoreto de α -N-acetilgalactosaminila, fluoreto de β -galactosila, fluoreto de β -manosila, fluoreto de β -glucosila, fluoreto de β -fucosila, fluoreto de β -xilosila, fluoreto de beta-sialila, fluoreto de β -N-acetilglucosaminila e fluoreto de β -N-acetilgalactosaminila são mais preferidos.

10 Fluoretos de glicosila podem ser preparados a partir de açúcares livres primeiramente acetilando o açúcar e em seguida tratando com Hf/piridina. Fluoretos de glicosila acetilados podem ser desprotegidos pela reação com base (catalítica) suave em metanol (por exemplo, NaO-Me/MeOH). Em adição, muitos fluoretos de glicosila são comercialmente
15 disponíveis. Outros derivados de glicosila ativado podem ser preparados usando métodos convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica., por exemplo, mesilatos de glicosila podem ser preparados pelo tratamento da forma hemiacetal completamente benzilada do açúcar com cloreto de mesila, seguido por hidrogeneização catalítica para remover os grupos
20 benzila.

Um componente adicional da reação é uma quantidade catalítica de um fosfato de nucleosídeo ou análogo do mesmo. Monofosfatos de nucleosídeo que são adequados para uso na presente invenção, incluem, por exemplo, monofosfato de adenosina (AMP), monofosfato de citidina (CMP),
25 monofosfato de uridina (UMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de ionosina (IMP) e monofosfato de timidina (TMP). Trifosfatos de nucleosídeo adequados para uso de acordo com a presente invenção incluem trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de citidina (CTP), trifosfato de uridina (UTP), trifosfato de guanosina (GTP), trifosfato de inosina (ITP) e trifosfato
30 de timidina (TTP). Um trifosfato de nucleosídeo preferido é UTP. Preferivelmente, o fosfato de nucleosídeo é um difosfato de nucleosídeo, por exemplo, adenosine difosfato (ADP), difosfato de citidina (CDP), difosfato de uridina

(UDP), difosfato de guanosina (GDP), difosfato de inosina (IDP) e difosfato de timidina (TDP). Um difosfato de nucleotídeo preferido é UDP. Como notado acima, também pode ser praticada com um análogo dos fosfatos de nucleosídeo. Análogos adequados incluem, por exemplo, sulfatos de nucleosídeos e sulfonatos. Ainda outros análogos incluem fosfatos simples, por exemplo, pirofosfatos.

Um procedimento para modificar proteínas recombinantes produzidas, em, por exemplo, células de murino em que a forma hidroxilada de predominantemente de ácido siálico (NGNA), é para tratar a proteína com sialidase, para remover ácido siálico tipo NGNA, seguido por galactosilação enzimática usando reagente Gal-UDP e beta 1,4 Galtransferase para produzir glicoformas G2 altamente homogêneas.

Onde a remoção ou eliminação de grupos de ácido siálico dos glicanos anexados à região Fc de anticorpos ou moléculas contendo Fc for desejada, uma sialidase pode ser adequada. Um número de sialidases de especificidade variada é conhecido na literatura. Uma sialidase de célula CHO adequada foi identificada (Ferrari et al, 1994, *Glycobiology* 4:367-373) e, se faltar no meio de cultura pode ser responsável pela remoção extracelular em siálico ou glicanos de proteínas recombinantes. Assim, é possível que a adição e remoção de grupos de ácido siálico possa ocorrer durante a produção de proteínas recombinantes que podem levar em consideração as estruturas de glicano variáveis e heterogênea sem proteínas produzidas por linhagens de células CHO.

Sialidases (neuraminidases) foram isoladas e clonadas a partir de uma variedade de espécies de bactérias para o homem com especificidades variáveis para substratos, por exemplo, glicoproteínas, glicolípidos, e gangliosídeos ou ligações. Enzimas com ampla especificidade para o tipo de grupo estático, por exemplo, ácidos neuramínicos hidroxilados (NGNA) ou não hidroxilados e ligações que podem ser $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ -, ou $\alpha 2,8$ - e ácidos siálicos ramificados ligados a um resíduo interno; incluem aqueles do *Clostridium perfringens* e sialidases de *Arthrobacter ureafaciens* (sialidase A, N-acetilneuraminato glicolihidrolase; EC 3.2.1.18). Enzimas purificadas estão

disponíveis comercialmente de, por exemplo, Proenzyme, Inc, San Leandro, CA. A sequência de nucleotídeo de do gene A ureafaciens sialidase gene foi clonada (NCBI Nº Acesso AY934539) by Lundbeck et al. 2005. Biotechnolo. Appl. Biochem 41:225-231.

5 Usando os métodos bem conhecidos na técnica, células hospedeira secretando enzimas capazes de agir em oligossacarídeos extracelulares podem ser construídas com ensinado em, por exemplo, US7,026,152 para culturas capazes de produção de etanol por fermentação de açúcares endogulcanases secretadas. Lundbeck et al. (supra) expressaram uma forma truncada de sialidase A, que foi capaz de remover resíduos de ácido siálico de muteínas de eritropoietina recombinante. A engenharia de uma célula hospedeira de mamífero capaz de expressão de um anticorpo terapêutico ou outra proteína contendo Fc e desialilação simultânea daquela proteína expressa no meio celular não foi demonstrada. A presente invenção demonstra
10 que a forma solúvel de sialidase A pode ser coexpressa por células de produção de anticorpo, e o produto de anticorpo resultante recuperado das culturas de tais células reduziram o conteúdo de ácido siálico em suas porções Fc de moléculas. O ácido siálico otimizou anticorpos de modo que a produção melhorou atividade ADCC quando comparado com anticorpos produzidos por linhagens de células convencionais.
15 20

Caracterização Estrutural de Variantes de Ácido Siálico

Para caracterização estrutural de variantes de ácido siálico contendo oligossacarídeos, as preparações de glicoproteína incluindo preparações de anticorpo foram tratadas com peptídeo-N-glicosidase para liberar os
25 oligossacarídeos ligados por N. A peptídeo-N-glicosidase F de enzima (PN-Gase F) cliva oligossacarídeos ligados por asparaginas. Os oligossacarídeos liberados foram fluorescentemente rotulados com ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico), purificados e analisados por HPLC como descrito (ver, Anumula, K. R. e Dhume ST Glycobiology. 1998 Jul; 8(7):685-94). Como mostrado na figura 3, os oligossacarídeos separados como G0, G1, G2, G2S1 e
30 G2S2 no cromatograma podem ser detectados e quantificados. Espécies aglicosiladas, naturalmente isentas de glicanos ou tendo sido química ou

enzimaticamente estirpadas de glicanos são designadas Gno.

Caracterização Biológica de Variantes de Ácido Siálico

Proteínas contendo Fc podem ser comparadas por funcionalidade por vários ensaios *in vitro* bem conhecidos. Em particular a afinidade de membranas da família Fc γ RI, Fc γ RII, e Fc γ RIII de receptores Fc γ é de interesse. Essas medições poderiam ser feitas usando formas solúveis recombinantes dos receptores ou formas associadas a células dos receptores. Em adição, a afinidade para FcRn, o receptor responsável pela meia-vida de circulação prolongada de IgGs pode ser medido, por exemplo, por BIAAnúcleo usando FcRn solúvel recombinante. Ensaios funcionais baseados em células, tais como ensaios ADCC e ensaios CDC, proveem clareza nas consequências funcionais de estruturas de variantes particulares. Em uma modalidade o ensaio ADCC é configurado para ter células NK agindo como a célula efetora primária, desse modo, refletindo os efeitos funcionais no receptor Fc γ RIIIA. Ensaios de fagocitose podem também ser usados para comparar funções efectoras imunes ou variantes diferentes, assim como os ensaios que mediram respostas celulares, tais como superóxido ou liberação de mediador inflamatório.

Ensaios de Afinidade e Avidéz

Anticorpos, que são naturalmente multivalentes, podem ser testados para determinar vários parâmetros de ligação a proteínas-alvo. Um formato conveniente para determinar um Kd aparente é o ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado a enzima) ou RIA (radio-imunoensaio). "ELISA" tem sido geralmente usado para significar um ensaio de ligação realizado em um suporte sólido usando métodos de detecção direta. Geralmente, em um ELISA, analitos solúveis são removidos da solução após especificamente ligar a reagentes de fase sólida. No método, os reagentes de fase sólida são preparados absorvendo um antígeno ou anticorpo em placas de microtitulação plásticas; em outros métodos, os reagentes de fase sólida são moléculas associadas a células. Em todos os protocolos, os reagentes de fase saída são incubados com reagentes secundários ou terciários covalentemente acoplados a uma enzima. Conjugados não ligados são removidos por lava-

gem e substrato cromogênico ou fluorogênico é adicionado. Como o substrato é hidrolisado pelo conjugado de enzima ligada, um produto colorido ou fluorescente é gerado. Finalmente, o produto é detectado visualmente ou com um leitor de placa de microtitulação. A intensidade de sinal gerado é proporcional à quantidade de analito inicial na mistura de teste.

Em uma variação do ensaio de fase sólida, um antígeno pode ser indiretamente imobilizado ou capturado, por exemplo, usando um anticorpo de captura imobilizado que reconhece um domínio irrelevante no antígeno ou usando um anticorpo ou outro ligante que liga uma "etiqueta" construída na proteína alvo, por exemplo, uma sequência de poli-histidina.

Um método alternativo de medir ligação de anticorpos contra antígenos de superfície é usar as células completas que expressam (naturalmente ou através de engenharia genética) um antígeno na superfície da célula. As células são incubadas com uma solução de teste contendo anticorpo primário. O anticorpo não ligado é lavado separadamente e as células são em seguida incubadas com uma enzima conjugada para anticorpos específicos para o anticorpo primário o conjugado de célula primária é lavado afastado e a solução de substrato adicionada. O nível de anticorpo primário ligado é proporcional à quantidade de hidrólise de substrato. Isto será quantitativo se o número de células por volume unitário for mantido constante. Alternativamente, a detecção pode ser feita usando um ligante radiorrotulado através de ligação direta ou competição como descrito acima. Protocolos para ensaios ELISA são encontrados em, por exemplo, In: Ausebel, FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2003 John Wiley & Sons, Inc.

Taxas de ligação, taxas de associação e taxas de dissociação, podem também ser medidas usando tecnologia BIAAnúcleo que usa um aglutinante ou ligante de fase sólida e uma aglutinante ou ligante de fase de solução móvel detectados por ressonância de superfície de plasma.

Métodos para Avaliar Função Efetora

O papel de glicosilação de anticorpo na clareza, e portanto farmacocinético de proteína contendo Fc terapêutico parece mínimo; pensou-se que ligação ao receptor Fc neonatal (FCRN) era responsável pela remo-

ção IgG da circulação, aparições não perturbadas pela falta de oligossacarídeos ligados por N na porção Fc de um anticorpo.

Os receptores Fc IgG (FcR) que ligam respostas imunes mediadas por anticorpo IgG com funções efetoras celulares incluem os receptores Fcγ: FcRI (CD64), FcRII (CD32) (ambos FcRIIA e FCRIIB), e FcRIII (CD16). Todos esses três são encontrados exibidos em monócitos. Entretanto, a elaboração desses receptores nas várias células-alvos parece ocorrer de forma diferente e em resposta a outros fatores. Portanto, medição da afinidade de bioterapêuticos contendo Fc modificados por glicosilação para receptores Fc γ é uma medição apropriada para prever funções efetoras melhoradas.

Abs IgG1 humano com baixos níveis de fucose em seus glicanos Fc têm sido relatados como tendo maior afinidade com FcR CD16 humano e drasticamente melhoraram atividade *in vitro* em ensaios ADCC usando células efetoras PBMC humanas (Shinkawa et al. J Biol Chem 278(5):3466-3473, 2003; Shields et al. J Biol Chem 277(30):26733-26740, 2002; Humana et al., Nat Biotech 17:176-180, 1999).

Um método de avaliar funções efetoras usando ensaio ADCC *in vitro* pode ser realizado em uma maneira quantitativa. Assim, um ensaio *in vitro* pode ser designado para medir a capacidade de ligar anticorpo para causar destruição da célula que exibe seu ligante cognato pela seleção correta de linhagens de célula-alvo e efetora e avaliando a célula "assassina" ou pela incapacidade das células de continuar dividindo ou pela liberação de conteúdos internos, por exemplo, liberação de ¹⁵C. A célula-alvo pode ser uma linhagem de célula que normalmente expressa um ligante alvo para o anticorpo, fragmento de anticorpo, ou proteína de fusão da invenção ou pode ser construída para expressar e reter a proteína alvo em sua superfície. Um exemplo de tal uma linhagem de célula construída é a célula K2, uma linhagem de célula de mieloma de camundongo Sp2/0 que estavelmente expressa em sua superfície TNF humano recombinante que permanece como uma forma de transmembrana devido à introdução de uma deleção de aminoácido 1-12 da citocina madura (Perez et al., Cell 63:251-258, 1990). Esta linha-

gem de célula é útil para avaliar alterações em atividade ADCC de anticorpos TNF, fragmentos de anticorpo, ou proteínas de fusão alvejando anti-TNFalfa construídas tendo domínios Fc ou atividade de domínio Fc.

As células efetoras para o ensaio de atividade ADCC *in vitro* podem ser PBMC (células de monocíticas de sangue periférico) de ser humano ou outra fonte de mamífero. Células efetoras PBMC podem ser novamente isoladas depois de coletar sangue de doadores por métodos aprovados. Outras células monocíticas ou macrófagos que podem ser usadas são aquelas derivadas de fluidos de efusões tais como exsudatos peritoneais.

Modelos *in vivo* para medir as funções imunes celulares são também disponíveis., por exemplo, anticorpos anti-CD3 podem ser usados para medir ativação de célula T em camundongos, porque a ativação da célula T depende da maneira na qual o domínio Fc de anticorpo e se acopla a receptores Fcγ específicos. *In vitro*, a atividade antitumoral de uma fucose elevada e uma versão de fucose baixa de um Ab IgG1 humano quimérico contra receptor 4 de quimiocina CC foi comparada, nenhuma diferença em sua atividade ADCC *in vitro* foi observada (usando células efetoras de camundongo), entretanto, o Ab de fucose baixa mostrou mais eficácia potente *in vivo*. Nenhuma célula efetora humana foi provida e os camundongos rete-ram células NK endógenas (Niwa et al. Cancer Res 64:2127-2133, 2004). Como o receptor CD16 em células NK humanas demonstrou sensibilidade melhorada para níveis de fucose de Abs IgG1, aqueles dados sugeriram que um mecanismo distinto daquele foi estudado em células efetoras humanas na operação com camundongos. Uma possibilidade é a descoberta mais recente de receptor CD16-2 de camundongo (Mechetina et al. Immunogen 54:463-468, 2002). O domínio extracelular de CD16-2 de camundongo tem identidade de sequência significativamente maior para CD16A humano (65%) do que o receptor CD16 de camundongo melhor conhecido, sugerindo que ele pode ser mais sensível a níveis de fucose de IgGs que ele liga do que CD16 de camundongo. Sua expressão relatada em macrófagos de camundongo semelhantes a células J774 é consistente com a possibilidade que aqueles macrófagos de camundongo expressando CD16-2 possa ser

responsável pela atividade antitumor mais elevada pelo Ab de fucose baixa descrito por by Niwa et al. (2004). Assim, o estudo de ligação de receptor Fc a Fc tipo IgG1 humano contendo proteínas para células efectoras de murino não é previsto.

5 Processos de Produção de Proteína

Diferentes processos envolvidos com a produção de proteínas contendo Fc podem impactar a estrutura de oligossacarídeos Fc, incluindo ácido siálico. Em uma modalidade, as células hospedeira que secretam proteína contendo Fc são cultivadas na presença de soro, por exemplo, soro bovino fetal (FBS), que não foi anteriormente submetido a um tratamento de aquecimento elevado (por exemplo, 56°C por 30 minutos). Isto pode resultar em proteína contendo Fc que contém nenhum, ou muito pouca quantidade de, ácido siálico, devido à presença natural no soro de enzimas de sialidase ativas que podem remover ácido siálico das proteínas contendo Fc secretadas daquelas células. Em outra modalidade, as células que secretam a proteína contendo Fc são cultivadas ou na presença de soro que foi submetido a um tratamento de aquecimento elevado, desse modo inativando enzimas de sialidase, ou na ausência de soro ou outros componente de meio que podem conter enzimas de sialidase, tal que a proteína contendo Fc tem níveis mais elevados de ácido siálico, para aplicações (por exemplo, indicações terapêuticas) quando aquelas podem ser desejáveis.

Em outra modalidade, as condições usadas para purificar e adicionalmente processar proteínas contendo Fc são estabelecidas que serão a favor de conteúdo de ácido siálico ideal., por exemplo, devido ao ácido siálico ser ácido lábil, de exposição prolongada a um ambiente de baixo pH, por exemplo, seguindo eluição de uma coluna de cromatografia A de proteína ou durante processos de inativação viral, pode simultaneamente levar a uma redução em um conteúdo de ácido siálico.

Engenharia de Célula Hospedeira

Como descrito aqui, a célula hospedeira escolhida para expressão da proteína contendo Fc recombinante ou anticorpo monoclonal é um importante contribuidor para a composição final, incluindo, sem limitação, a

variação na composição das porções de oligossacarídeos decorando a proteína no domínio Ch2 de imunoglobulina. Assim, um aspecto da invenção envolve a seleção de células hospedeira apropriadas para uso e/ou desenvolvimento de uma célula de produção que expressa a proteína terapêutica desejada.

Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula que é naturalmente deficiente ou isenta de sialitransferases. Em outra modalidade, a célula hospedeira é geneticamente modificada ou tratada de modo a ser isenta de sialitransferases. Em uma modalidade adicional, a célula hospedeira é uma linhagem de célula hospedeira derivada selecionada para expressar níveis reduzidos ou não detectáveis de sialitransferases. Em ainda outra modalidade, a célula hospedeira é naturalmente isenta de, ou geneticamente modificada ou tratada de modo a ser isenta de, sintetase de ácido siálico COM, a enzima que catalisa a formação de ácido siálico COM, que é a fonte de ácido siálico pela sialiltransferase para transferir ácido siálico para o anticorpo. Em uma modalidade relacionada, a célula hospedeira pode ser naturalmente isenta ou, é geneticamente modificada ou tratada de modo a ser isenta de, sintetase de ácido pirúvico, a enzima que forma ácido siálico a partir do ácido pirúvico.

Em uma modalidade adicional, a célula hospedeira pode ser naturalmente isenta de, ou é geneticamente modificada ou tratada de modo a ser isenta de, galactosiltransferases, tal que anticorpos expressaram nas células sem galactose. Sem galactose, o ácido siálico não pode ser anexado. Em uma modalidade separada, a célula hospedeira pode ser naturalmente sobre-expressa, ou ser geneticamente modificada para sobre-expressar, uma enzima de sialidase que remove ácido siálico dos anticorpos durante produção. Tal uma enzima de sialidase pode agir intracelularmente antes dos anticorpos serem secretados ou serem secretados no meio de cultura e agir em anticorpos que já foram secretados no meio. Métodos de selecionar linhagens de célula com glicosilases alteradas e que expressam glicoproteínas com composições de carboidrato alteradas foram descritos. (Ripka and Stanley, 1986. Somatic Cell Mol Gen 12:51-62; US2004/0132140). Métodos de

engenharia de células hospedeira para produzir anticorpos com padrões de glicosilação alterados resultando em ADCC melhorado foram ensinados em, por exemplo, U.S. Pat. 6,602,864, em que as células hospedeira suportam um ácido nucleico que codifica pelo menos uma glicosil transferase de modificação de glicoproteína, especificamente.

β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)

Outras abordagens para engenharia genética de propriedades de uma célula hospedeira através de manipulação de glicosiltransferase de célula hospedeira envolvem eliminação ou supressão da atividade, como ensinado na EP1,176,195, especificamente, alfa1,6 fucosiltransferase (produto de gene FUT8). Seria óbvio para um versado na técnica praticar outros métodos de engenharia de célula hospedeira do que aqueles exemplos específicos citados acima. Adicionalmente, a engenharia de célula hospedeiro pode ser de origem mamífera ou pode ser selecionada de mieloma, linfoma, levedura, inseto ou células vegetais, ou qualquer derivado, célula imortalizada ou transformada dos mesmos.

Em uma modalidade, o método de suprimir ou eliminar a atividade da enzima requerida para a anexação do ácido siálico pode ser selecionado a partir do grupos consistindo em silencio do gene, tal como pelo uso de siRNA, nulo genético, ou adição de um inibidor de enzima, tal como co-expressão de um Ab intracelular ou peptídeo específico para a enzima que liga e bloqueia sua atividade enzimática, e outras técnicas de engenharia conhecidas. Em outra modalidade, um método de melhorar a expressão ou atividade de uma enzima que bloqueia anexação de ácido siálico, ou uma enzima de sialidase que remove ácidos siálicos que já estão anexados, pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em transfecções com genes de enzima recombinante, transfecções de fatores de transcrição que melhoram síntese de RNA de enzima, ou modificações genéticas que melhoram estabilidade de RNA de enzima, todos levando a atividade melhorada de enzimas, tais como sialidasas, que resulta em níveis inferiores de ácido siálico no produto purificado. Em outra modalidade, inibidores de enzima específicos podem ser adicionados ao meio de cultura celular.

Anticorpos

Um anticorpo descrito neste pedido pode incluir ou ser derivado de qualquer mamífero, tal como, mas não limitado a, um ser humano, um camundongo, um coelho, um rato, um roedor, um primata, ou qualquer combinação dos mesmos e inclui anticorpos isolados de ser humano isolado, 5 primata, roedor, mamífero, quimérico, humanizado e/ou CDR grafitado anti-integrina, imunoglobulinas, produtos de clivagem e outras porções específicas e variantes dos mesmos. A invenção também refere-se a codificação de anticorpo ou ácidos nucleicos complementares, vetores, células hospedeiro, 10 composições, formulações, dispositivos, animais transgênicos, plantas transgênicas, e métodos de fazer e usar os mesmos, como descrito aqui juntamente como combinado com o que é conhecido na técnica.

A presente invenção adicionalmente provê células, linhagens de células, e culturas de células que expressam uma imunoglobulina ou frag- 15 mento da mesma capaz de glicosilação em um domínio CH2 que liga um antígeno, uma citocina, uma integrina, um anticorpo, um fator de crescimento, um antígeno de superfície que é um marcador de uma linhagem de célula e diferenciação, um hormônio, um receptor ou proteína de fusão do mesmo, um proteína de sangue, uma proteína envolvida em coagulação, qualquer 20 fragmento da mesma, e qualquer análogo estrutural ou funcional de qualquer um dos acima mencionados. Em uma modalidade preferida, a imunoglobulina, fragmento ou derivado da mesma liga um antígeno sobre a superfície de uma célula-alvo. Em uma modalidade particularmente preferida, a célula-alvo e uma célula de tumor, uma célula de uma vasculatura de tumor, ou 25 uma célula imune. Em uma modalidade específica, a imunoglobulina, fragmento ou derivado da mesma liga-se a TNF, uma integrina, um antígeno de célula B, ou fator de tecido.

Em ainda outra modalidade, células, linhagens de células, e culturas de células da presente invenção podem ser detectavelmente expres- 30 sas em uma proteína de fusão que compreende um fator de crescimento de hormônio. Exemplos de fatores de crescimento contemplados pela presente invenção incluem, mas não são limitados a, fator de crescimento humano,

fator de crescimento derivado de plaquetas, um fator de crescimento epidermal, um fator de crescimento de fibroblasto, um fator de crescimento de nervo, uma gonadotropina coriônica humana, uma eritropoietina, uma trombopoietina, uma proteína morfogênica óssea, um fator de crescimento de transformação, um fator de crescimento como a insulina, ou um peptídeo como glucagon, e qualquer análogo estrutural ou funcional dos mesmos.

Anticorpos isolados da invenção incluem aqueles tendo isotipos de anticorpo com atividade ADCC, especialmente IgG1 humano, (por exemplo, IgG1kappa e IgG1lamda), e, menos preferidos são IgG2 e IgG3, ou isotipos híbridos contendo resíduos alterados em resíduos específicos nos domínios Fc são suas contra-partes de outras espécies. Os anticorpos podem ser anticorpos de comprimento completo (por exemplo, IgG1) ou podem incluir uma porção de antígeno de ligação e uma porção Fc ou domínio capaz de elicitar funções efectoras incluindo ADCC, ativação de complemento, e ligação de C1q.

Além do mais, o fragmento de imunoglobulina produzido pelas células, linhagens de célula, e culturas de células da presente invenção podem incluir, mas não são limitados a, Fc ou outro domínio CH2 específico contendo estruturas e qualquer análogo estrutural ou funcional dos mesmos. Em uma modalidade, o fragmento de imunoglobulina é um polipeptídeo de fusão de domínio de receptor quimérico. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo de fusão de domínio de receptor quimérico é etanercept. Etanercept é uma molécula de receptor TNF α solúvel recombinante que é administrada subcutaneamente e se lia a TNF α no soro do paciente, tornando-a biologicamente inativa. Etanercept é uma proteína de fusão dimérica consistindo na porção de ligação de ligante extracelular do receptor de fato de necrose de tumor (TNFR) 75 quiloDáltons (p75) tumor necrosis factor receptor de ser humano ligado à porção Fc de IgG1 humano. O componente Fc de etanercept contém o domínio CH2, o domínio CH3 e a região de hinge, mas não o domínio CH1 de IgG1.

Outros produtos amenos para fabricação usando linhagens de células da invenção incluem proteínas terapêuticas ou profiláticas fabricadas

por outros tipos de linhagens de célula animal e tendo CH2 capaz de ser glicosilado. Particularmente preferidos são aqueles terapêuticos, glicosilados domínios CH2 contendo proteínas que se ligam a antígenos-alvos em uma superfície celular, tal tipo de célula é desejável para incapacitar ou eliminar do corpo. Um número de tais anticorpos terapêuticos para conter um IgG1 humano, especialmente o IgG1, cadeia pesada que compreende um domínio CH1, CH2, e CH3 humano. Tais proteínas terapêuticas incluem, mas não são limitadas àquelas descritas aqui abaixo.

Infliximab agora vendido como REMICADE[®]. Infliximab anticorpo monoclonal IgG1k quimérico com um peso molecular aproximado de 149,100 Dáltons. É compreendido de regiões constantes humanas e variáveis de murino. Infliximab se liga especificamente a fator alfa de necrose humana (TNF(alfa)) com uma constante de associação de 10^{10} M⁻¹. Infliximab neutraliza a atividade biológica de TNF(alfa) ligante-se com alta afinidade a formas solúveis e de transmembrana de TNF(alfa) e inibe ligação de TNF(alfa) a seus receptores. Células expressando TNF(alfa) de transmembrana ligada por infliximab podem ser lisadas *in vitro* ou *in vivo*. Infliximab é indicado para o tratamento de artrite reumatoide, doença de Crohn, e espondilite de alquilação. Infliximab é dado como doses de 3 a 5 mg/kg dado como uma infusão intravenosa permitida com doses similares adicionais em 2, 6, e/ou 8 semanas depois e em intervalos de a cada a 8 semanas dependendo da doença a ser tratada.

Daclizumab (vendido como ZENAPAX[®]) é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado imunossupressivo produzido por tecnologia de DNA recombinante que se liga especificamente a subunidade alfa (p55 alfa, CD25, ou subunidade Tac) do receptor de interleucina-2 (IL-2) de alta afinidade que é expresso na superfície de linfócitos ativados. Daclizumab é um anticorpo quimérico de ser humano-camundongo desenhados de regiões de determinação complementar (CDR). As sequências humanas foram derivadas de domínios constantes de IgG1 humano e de regiões de enquadramento variáveis do anticorpo de mieloma Eu. As sequências mirinas foram derivadas das CDRs de um anticorpo anti-Tac de murino. Daclizumab é indicado

para a profilaxia de rejeição de órgão aguda em pacientes que recebem transplantes renais e é geralmente usado como parte de um regime imunossupressivo que inclui ciclosporina e corticosteroides.

5 Basiliximab (vendido como SIMULECT®) é um anticorpo monoclonal (murino/humano) quimérico produzido por tecnologia de DNA recombinante, que funciona como um agente imunossupressivo, especialmente ligante-se a e bloqueando (IL-2R(alfa) de cadeia(alfa) de interleucina-2, também conhecida como (antígeno D25) sobre a superfície de linfócitos T ativados. Com base na sequência de aminoácidos, o peso molecular calculado
10 da proteína é 144 quilodáltons. É uma glicoproteína obtida de fermentação de uma linhagem de célula de mieloma de camundongo estabelecida geneticamente construída para expressar plasmídeos contendo os genes da região constante de cadeia leve e pesada de ser humano (IgG1) e genes da região variável de cadeia leve e pesada de camundongo que codifica o anticorpo RFT5 que se liga seletivamente a IL-2R(alfa). Basiliximab é indicado
15 para a profilaxia de rejeição de órgão aguda em pacientes que recebem transplante renal quando usado como parte de um regime imunossupressivo que inclui ciclosporina e corticosteroides.

20 Adalimumab (vendido como HUMIRA®) é um anticorpo monoclonal IgG1 humano recombinante específico para fator de necrose de tumor humano (TNF). Adalimumab foi criado usando tecnologia de exibição de fago resultando em um anticorpo com regiões variáveis de cadeia leve e pesada derivadas de ser humano e regiões constantes Kapa IgG1 humano. HUMIRA® é indicado para reduzir sintomas e inibir a progressão de danos
25 estruturais em pacientes adultos com artrite reumatoide de moderada a severa que têm tido resposta inadequada a um ou mais DMARDs. HUMIRA® pode ser usado sozinho ou em combinação com MTX ou outros DMARDs.

30 Rituximab (vendido como RITUXAN®) é um anticorpo monoclonal de murino/humano quimérico geneticamente construído direcionado contra o antígeno CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais e malignos. O anticorpo é uma imunoglobulina capa IgG1 contendo sequências de regiões variáveis de cadeia leve e pesada de murino e sequências de

região constante de ser humano. Rituximab tem uma afinidade de ligação para o antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM. Rituximab é indicado para o tratamento de pacientes com linfoma de células B não Hodgkin relapsas ou refratórias, baixo grau ou folicular, CD20-positivas. RITUXAN® é dado em 375 mg/m² IV de infusão uma vez por semana por 4 ou 8 doses.

Trastuzumab (vendido como HERCEPTIN®) é um anticorpo monoclonal humanizado derivado de DNA recombinante que seletivamente se liga em um ensaio com base em célula (Kd=5nM) a um domínio extracelular da proteína 2 do receptor de fator de crescimento epidermal humano, HER2. O anticorpo é um capá IgG 1 que contém regiões de enquadramento humano com as regiões de determinação complementares de um anticorpo murino (4D5) que se liga a HER2. HERCEPTIN é indicado como terapia de agente único para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático cujos tumores sobre-expressam a proteína HER2 e os quais têm recebido um ou mais regimes quimioterápicos para sua doença metastática. HERCEPTIN® em combinação com paclitaxel é indicado para o tratamento de pacientes com câncer metastático cujos tumores sobre-expressam a proteína HER2 os quais não têm recebido um ou mais regimes quimioterápicos para sua doença metastática. A dosagem recomendada é uma dose de carga inicial de 4 mg/kg de trastuzumab administrado como uma infusão de 90 minutos e uma dose de manutenção uma vez por semana de 2 mg/kg de trastuzumab que pode ser administrado como uma infusão de 30 minutos se a dose de carga inicial foi bem tolerada.

Alemtuzumab (vendido como CAMPATH®) é um anticorpo monoclonal humanizado derivado de DNA recombinante (Campath-1H) que é direcionado contra a glicoproteína de superfície de célula kD 21-28, CD52. Alemtuzumab se liga a CD52, um antígeno de não modulação que está presente na superfície de essencialmente todos os linfócitos B e T, a maioria dos monócitos, macrófagos, e células kD, uma subpopulação de granulócitos, e tecidos do sistema reprodutor masculino. O anticorpo Campath-1H é um capá IgG1 com regiões constantes e de enquadramento variáveis humano, e regiões de determinação complementar a partir de um anticorpo mono-

clonal de murino (rato) (Campath-1G). Campath é indicado para o tratamento de leucemia linfótica crônica de célula B (B-CLL) em pacientes que têm sido tratados com agentes de alquilação e que falharam com terapia de fludarabine. A determinação da eficácia de Campath é baseada em taxas de resposta gerais. Campath é dado inicialmente em 3 mg administrado como uma infusão IV de 2 horas diariamente; uma vez tolerada a dose diária deve ser escalada para 10 mg e continuado até tolerância. Uma vez que este nível de dose é tolerado a manutenção de Campath 30 mg pode ser iniciada e administrada três vezes por semana até 12 semanas. Em muitos pacientes, a escala para 30 mg pode ser realizada em 3-7 dias.

Omalizumab (vendido como XOLAIR®) é um anticorpo monoclonal IgG1(capa) humanizado recombinante que seletivamente se liga à imunoglobulina E (IgE) humana. Omalizumab inibe a ligação de IgE ao receptor IgE de alta afinidade (Fc(epsilon)RI) na superfície de células mastócitos e basófilas. A redução em IgE ligado à superfície sobre células que portam Fc(epsilon)RI limita o grau de liberação de mediadores da resposta alérgica. O tratamento com omalizumab também reduz o número de receptores Fc(epsilon)RI em basófilos em pacientes atópicos. Omalizumab é indicado para adultos e adolescentes (12 anos de idade e acima) com asma moderada a severa que têm um teste de pele positivo ou reatividade *in vitro* a um aeroalérgeno perenial e cujos sintomas são inadequadamente controlados com corticosteroides inalados. Omalizumab é administrado SC a cada 2 ou 4 semanas em uma dose de 150 a 375 mg.

Efalizumab (RAPTIVA®) é anticorpo monoclonal de isótipo IgG1 capa humanizado recombinante que se liga a uma célula CD11a. Efalizumab se liga a CD11a, a subunidade (alfa) antígeno-1 de função de leucócito (LFA-1), que é expresso em todos os leucócitos, e diminui expressão de superfície de célula de CD11a. Efalizumab inibe a ligação de LFA-1 a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), desse modo inibindo a adesão de leucócitos a outros tipos de célula. Interação entre LFA-1 e ICAM-1 contribui para iniciação e manutenção de múltiplos processos, incluindo ativação de linfócitos T, adesão de linfócitos T a células endoteliais, e mitigação de linfócitos T

a sítios de inflamação incluindo pele com psoríase. Ativação de linfócito e tráfego para pele tem um papel na patofisiologia de psoríase em placas crônica. Em pele com psoríase, a expressão da superfície de célula ICAM-1 é regulada no endotélio e ceramitócitos. CD11a é também expressa na superfície de linfócitos B, monócitos, neutrófilos, células assassinas naturais, e outros leucócitos. Portanto, o potencial existe para efalizumab em afetar a ativação, adesão, mitigação, e números de células que não linfócitos T. A dose recomendada de RAPTIVA® é uma dose de condicionamento única de 0,7 mg/kg SC seguida por doses SC semanais de 1 mg/kg (dose única máxima não exceder um total de 200 mg).

Em outra modalidade, uma linhagem de célula da invenção é estavelmente transfectada ou de outra maneira construída para expressar uma não imunoglobulina derivada de polipeptídeo, mas que esteja dentro da definição de uma proteína contendo Fc.

Os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos e proteínas desta invenção podem ser derivados de várias maneiras bem conhecidas na técnica. Em um aspecto, os anticorpos são convenientemente obtidos a partir de hibridomas preparados por imunização de um camundongo com os peptídeos da invenção. Os anticorpos podem assim ser obtidos usando qualquer uma das técnicas de hibridoma bem conhecidas na técnica, ver, por exemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, anticorpos, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), cada uma incorporada aqui para referência.

Em outro método conveniente de derivação da porção alvos de ligação do anticorpo, tipicamente os domínios leves variáveis e/ou pesados variáveis de um anticorpo, essas porções são selecionadas a partir de uma biblioteca de tais domínios de ligação criados em, por exemplo, uma biblio-

teca de fago. Uma biblioteca de fago pode ser criada inserindo uma biblioteca de oligossacarídeos aleatórios ou uma biblioteca de polinucleotídeos contendo sequências de interesse, tais como das células B de um animal imunizado ou ser humano (Smith, G.P. 1985. *Science* 228: 1315-1317). Bibliotecas de fago de anticorpo contêm pares de região de cadeia pesada (H) e leve (L) em um fago permitindo a expressão de fragmentos Fv de cadeia única ou fragmentos Fab (Hoogenboom, et al. 2000, *Immunol. Today* 21(8) 371-8). A diversidade de uma biblioteca de fagomídeo pode ser manipulada para aumentar e/ou após imunoespecificidades dos anticorpos monoclonais da biblioteca produzir e subsequentemente identificar anticorpos adicionais, desejáveis de ser humano., por exemplo, os genes de codificação de molécula de imunoglobulina de cadeia pesada (H) e leve (L) podem ser aleatoriamente misturados para criar novos pares HL em uma molécula de imunoglobulina montada. Adicionalmente, um ou outro ou ambos os genes de cadeias H e L podem ser mutagenizados em uma região de determinação complementar (CDR) da região variável do polipetídeo de imunoglobulina, e subsequentemente selecionados para afinidade desejável e capacidades de neutralização. Bibliotecas de anticorpo também podem ser criadas sinteticamente por seleção de uma ou mais sequências de enquadramento humanas e introdução de coleta de cassetes CDR derivados de repertórios de anticorpo humano ou através de variação designada (Kretzschmar and von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:598-602). As posições de diversidade não são limitadas a CDRs, mas também podem incluir os segmentos de enquadramento das regiões variáveis ou podem incluir outras regiões que não as regiões variáveis de anticorpo, tais como peptídeos.

Outras bibliotecas de componentes alvos de ligação que podem incluir outras regiões que não regiões variáveis de anticorpo são exibição de ribossoma, exibição de levedura, e exibições bacterianas. A exibição de ribossoma é um método de mRNAs de tradução para suas proteínas de cognato enquanto mantém a proteína anexada ao RNA. A sequência de codificação de ácido nucleico é recuperada por RT-PCR (Mattheakis, L.C. et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022). Exibição de levedura é baseada

na construção de proteínas de fusão de receptor de adesão de levedura de alfa aglutinina associada à membrana, aga1 e aga2, uma parte do sistema do tipo de combinação (Broder, et al. 1997. Nature Biotechnology, 15:553-7). Exibição bacteriana é baseada na fusão do alvo para exportar proteínas bacterianas que associam-se com a membrana celular ou parede celular (Chen and Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79:496-503).

Em comparação com a tecnologia de hibridoma, o fago ou outro anticorpo exhibe métodos que permitem a oportunidade de manipular seleção contra antígeno-alvo *in vitro* e sem limitação da possibilidade de hospedeiro agir sobre o antígeno ou vice-versa.

Células Hospedeiras

As células hospedeira deste documento compreendem células hospedeira capazes de produzir anticorpos específicos com conteúdo de ácido siálico definido no conteúdo de oligossacarídeo dos anticorpos.

Diferentes de muitos genes que são transcritos de sequências de DNA genômicas contínuas, são genes de anticorpo de segmentos de gene que podem ser amplamente separados na linhagem de gérmen. Em particular, genes de cadeia pesada são formados por recombinação de três segmentos genômicos que codificam as regiões variáveis (V), diversidade (D), e junção (J)/constantes (C). Genes de cadeia leve funcionais são formados por dois segmentos de genes; um codifica a região V e outro codifica a região J/C. Ambas a cadeia pesada e a cadeia leve capa local contêm muitos segmentos de gene V (estimativas variam entre 100s e 1000s) estimadas para cobrir poços sobre 1000 kb. O locus lâmbda é, por contraste, muito menor e foi mostrado cobrir aproximadamente 300 kb no cromossoma 16 no camundongo. Ele consiste em dois segmentos de gene variável e quatro segmentos de gene de região de junção/constante (J/C). A formação de um gene funcional requer recombinação entre um elemento V e um J/C.

Na célula B em que o anticorpo é naturalmente produzido, o controle de transcrição de ambos os genes de cadeias pesada e leve capa dependem da atividade de um promotor específico de tecido a montante da região V e um intensificador específico de tecido localizado no intron J-

C. Esses elementos agem sinergisticamente. Também, um segundo intensificador específico de célula B foi identificado no locus de cadeia leve capa. Este intensificador adicional é localizado 9 Kb a montante de C_{kappa}. Assim, o método de hibridoma de imortalizar genes de expressão de anticorpo permanece no promotor endógeno e sequências de intensificador da linhagem de célula B de origem. Alternativamente, ácidos nucleicos da presente invenção podem ser expressos em um célula hospedeira ligante (por manipulação) em uma célula hospedeira que contém DNA endógeno que codifica um anticorpo da presente invenção. Tais métodos são bem conhecidos na técnica, por exemplo, como descrito nas Patentes US N^{os} 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, e 5,733,761, totalmente incorporados aqui para referência.

Clonagem de DNA genômico de anticorpo em um vetor artificial é outro método de criar células hospedeira capazes de expressar anticorpos. Entretanto, expressão de anticorpos monoclonais atrás de fortes promotores aumenta as chances de identificar linhagens de células de produção elevada e obter rendimentos maiores de anticorpos monoclonais. Anticorpos da invenção podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinantes e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (por exemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Sistemas para clonagem e expressão de um polipeptídeo em uma variedade de diferentes células hospedeira são bem conhecidos. Células hospedeira adequadas incluem, bactérias células de mamíferos, células vegetais, sistemas de levedura e baculovírus e plantas transgênicas e animais. Linhagens de célula de mamífero disponíveis na técnica para expressão de proteínas glicosiladas intactas de um polipeptídeo incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células bebês de fígado de hamster (BHK), células de melanoma de camundongo NSO e linhagem de células derivadas, por exemplo, SP2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662) células de mieloma de rato, células de fígado embriônico humano (HEK), células de retina embriônica humana, células PerC.6, células hep G2, BSC-1 (por e-

xemplo, ATCC CRL-26) e muitas outras disponíveis de, por exemplo, coleta de cultura tipo americana, Manassas, Va (www.atcc.org). Um hospedeiro bacteriano comum preferido é *E. coli*.

Célula de mamíferos tais como células CHO, células de mieloma, células HEK293, células BHK (BHK21, ATCC CRL-10), células Ltk de camundongo, e células NIH3T3 foram frequentemente usadas para expressão estável de genes heterólogos. Linhagem de células tais como Cos (COS-1 ATCC CRL 1650; COS-7, ATCC CRL-1651) e HEK293 são rotineiramente usadas para expressão transiente de proteínas recombinantes.

Células hospedeira de mamífero para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de mieloma tais como Sp2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), NSO, e P3X63.Ag8.653 (por exemplo, SP2/0-Ag14) devido à sua alta taxa de expressão. Em particular, para uso com células de mieloma NOS, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão de gene GS descrito em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338,841. Quando vetores de expressão recombinantes codificando genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeira de mamíferos, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeira por um período de tempo suficiente para permitir expressão do anticorpo nas células hospedeira ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeira são crescidas. Anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão.

Células CHO-K1 e CHO DHFR⁻ DG44 e DUK-B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4216–4220) são usadas para produção de proteína de alto nível porque a ampliação de genes de interesse é permitida pela incorporação de um marcador selecionável amplificável, DHFR usando, por exemplo, o fármaco metotrexato (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185: 537–566). Células CHO DHFR⁻ pode ser usadas de modo bem-sucedido para produzir mAbs recombinante em um nível elevado. CHO DHFR⁻ podem produzir anticorpos anti-MCP-1 na taxa de 80–110 mg 10⁶ células⁻¹ dia⁻¹ ou mais do que 200 mg 10⁶ células⁻¹ dia⁻¹. Uma variedade de promotores tem sido usada para obter expressão

de cadeias H e L nessas células CHO, por exemplo, o promotor de b-actina, promotor CMV MIE humano, o promotor de vírus Ad (MLP), o promotor RSV, e um LTR de vírus de leucemia de murino. Vários vetores para expressão mAb são descritos na literatura em que duas cadeias Ig são portadas por dois diferentes plasmídeos com um marcador selecionável/amplificável independente. Vetores contendo uma cadeia de anticorpo, por exemplo, a cadeia H, ligada a um marcador DHFR, e um cassete de expressão de cadeia L como marcador Neo^r ou vice-versa para poder ser usado para obter até 180 mg de um mAb L⁻¹ humanizado 7 dia⁻¹ em frascos giratórios. Os métodos usados para seleção inicial e amplificação subsequente podem ser variados e são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Em geral, expressão de mAb de nível elevado pode ser obtida usando as seguintes etapas: seleção inicial e amplificação subsequente de clones candidatos, cosseleção (por exemplo, casos onde ambos os vetores de expressão de cadeia H e cadeia L portam unidade de expressão DHFR), e amplificação, coamplificação usando diferentes marcadores amplificáveis, e seleção inicial e amplificação em cultura de massa, seguido por diluição de clonagem para identificar clones de expressão elevada individuais. Devido a sítios de integração poderem influenciar a eficácia de expressão de cadeia H e cadeia L e expressão de mAb total, vetores únicos foram criados nos quais as duas unidades de expressão de cadeia Ig são colocadas em tandem. Esses vetores também portam um marcador selecionável dominante tal como Neo^r e o cassete de expressão DHFR. Para uma revisão ver, Ganguly, S. and A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 by John Wiley & Sons, Inc..

Cockett et al. (1990. Bio/Technology 8, 662–667) desenvolveram o sistema GS para expressão de nível elevado de genes heterólogos em células CHO. Transfecção de um vetor de expressão contendo um cDNA (sob o controle transcricional do promotor hCMV) e um minigene GS (so o controle do promotor até SV40) nas células CHO-K1 (seguido por seleção com 20 mM a 500 mM MSX) podem ser usados para fornecer clones que

expressam anticorpos da invenção em rendimentos comparáveis aqueles do sistema CHO DHFR-. O sistema GS é discutido por completo ou em parte em conexão com as Patente Européias N^{os} 0 216 846, 0 256 055, e 0 323 997 e Pedido de Patente Européia N^o 89303964.4.

5 Enquanto se descrever a invenção em termos gerais, as modalidades da invenção serão adicionalmente descritas nos seguintes exemplos.

Exemplo 1: MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ANTICORPOS DE GALACTOSILAÇÃO E SIALILAÇÃO

Para amostras de anticorpo purificado por galactosilato via método enzimático, β -1,4-galactosiltransferase de bovino (β 1,4GT) e UDP-Gal obtido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) foram adicionados a amostras de anticorpo. α -2,3-sialiltransferase (α 2,3ST) de fígado de rato recombinante, α -1,3-galactositransferase (α 1,3GT) recombinante e CMP-Sia foram obtidos de Calbiochem (San Diego, CA). PNGase F foi obtido de New England Biolabs (Beverly, MA) ou de Prozyme (San Leandro, CA) ou de Selectin BioSciences (Pleasant Hill, CA). β -Galactosidase e β -glucosaminidase de *Diplococcus pneumoniae* foram obtidos de ou ProZyme ou de Selectin BioSciences. β -Galactosidase de rim bovino e todas as outras enzimas foram ou de ProZyme ou de Selectin BioSciences. Colunas A de proteína NAP-5 e Hi-Trap foram de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Uma forma desglicolisada enzimaticamente (chamada Gno) de Ab1 foi preparada para servir como um anticorpo de controle que não tem função efetora imune de Fc. Esta variante foi preparada tomando Ab1 (~10 mg em 1,0 mL de tampão) em 100 mM MES de tampão (pH 7,0) e tratando com 1000 U de PNGase F a 37°C por 24 horas. Outra alíquota de enzima foi adicionada e a incubação foi continuada por 24 horas adicionais. O Ab1 desglicosilado foi purificado usando coluna A de proteína HiTrap e formulado em PBS, pH 7,0. A glicoforma Gno foi caracterizada por MALDI-TOF-MS para confirmar a desglicosilação.

Em adição às preparações Ab manipuladas por laboratório, sublotos de Ab naturalmente diferem em conteúdo de ácido siálico, referido aqui

como 'variantes naturais', foram também comparados. O anticorpo não modificado foi chamado de PBS Ab1 após material do lote original ter sido trocado em tampão para PBS. Abs monoclonais IgG1 Ab1 e Ab3, nos quais membros de um par diferiu na extensão de sialilação Fc, aparentemente devido aos processos de produção diferentes usados para prepará-los (mas produzidos pelo mesmo tipo de célula hospedeira). As variantes Ab1, Ab1-20 e Ab1-29, continham 20% e 29% de glicanos sialilados, respectivamente, e variantes Ab5, Ab5-20 e Ab5-26, continham 0% e 26% de glicanos sialilados, respectivamente. Ao contrário, membros de cada par tiveram a mesma sequência de aminoácido, os mesmos níveis de fucosilação Fc e conteúdo GlcNAc de bisseção (análise de espectrometria de massa MALDI-TOF), e o mesmo baixo nível de agregados Ab (<1% por análise SEC-HPLC).

Um resumo de preparações Ab e Proteína contendo Fc usados em vários bioensaios e a maneira na qual eles foram derivados é resumido na tabela 1.

Tabela 1: Lista de Resumo de Preparações de Proteínas Contendo Fc Usadas Aqui.

Anticorpo original	Variante específica	% de sialilação	Descrição
Ab1	-	-	Anticorpo IgG1 humano anti-TNF
	Ab1 não modificado, Ab1- 29	29	Em formulação original, variante de ácido siálico natural
	Ab1 Gno	N.A.	Declicosilado enzimaticamente
	Ab1PBS	29	Não modificado, troca de tampão para PBS
	Ab1-20	20	Variante de ácido siálico natural
	Ab1MAAB	43	Ligado a coluna de lectina MAA
	Ab1WGAB	32	Ligado a coluna de lectina WGA

Anticorpo original	Variante específica	% de sialilação	Descrição
	Ab1WGAR	40	Retardado por coluna de lectina WGA
	Ab1WGAT	29	Passado através de coluna de lectina WGA
	Ab1-WGAR-41	41	Retardado por coluna de lectina WGA
	Ab1-WGAT-29	29	Passado através de coluna de lectina WGA
	Ab1 G2	0	Enzimaticamente modificado para completa galactosilação
	Ab1 G2S2(hi)	95	Enzimaticamente modificado para G2S2
	Ab1 G2S2(lo)	33	G2S2 que perde a maioria do ácido siálico
Ab 2	-	-	anticorpo IgG1 humano anti-TNF
	Ab2 não modificado	5%	Não modificado usado em ligação FcγRI, Figura 6
	Ab2 G2	0%	modificado; usado em estudo de camundongo PK, Figura 8
	Ab2 G2S2	~90%	modificado; usado em estudo de camundongo PK, Figura 8
	Ab2 AlaAla	Não relevante	anti-TNF de mutante que não tem afinidade para FcγR

Anticorpo original	Variante específica	% de sialilação	Descrição
	Ab2 GT-WGAT	5	Passado através de coluna de lectina WGA
	Ab2 GT-WGAR	67	Galactosilado e ligado a coluna de lectina WGA
Ab3	-	-	Específico para uma subunidade de citocina
	Ab3(lo)	2	variante de ácido siálico natural
	Ab3(hi)	42	variante de ácido siálico natural
Ab4	Ab4	-	IgG1 de camundongo (não tem afinidade para FcγRI humano)
Ab5	Ab5		Liga receptor de superfície de célula heterodimérica
	Ab5-0	0	Variante de glicosilação natural
	Ab5-26	26	Variante de glicosilação natural
FcP1	-	-	Proteína não Ab, contendo Fc
	FcP1 não modificado	5	Não modificado, para PK, Figura 8
	FcP1 G2S2	~98	Modificado para G2S2, para PK, Figura 8

Todas as amostras de teste continham domínios de hinge IgG₁, CH2, e CH3. Ab1, Ab2, Ab3, e Ab5 são Abs IgG monoclonais com regiões constantes IgG1 e capa. Ab1 é um Ab completamente humano Ab específico para TNF humano e Ab2 é um Ab quimérico de camundongo/humano específico para TNF humano. Ab3 é um Ab completamente humano específico para uma das subunidades de uma citocina pró-inflamatória heterodimérica.

Todos os quatro Abs foram expressos em células de mieloma de camundongo Sp2/0 transfectadas. Ab5 é um anticorpo completamente humano direcionado a uma subunidade de um receptor de superfície de célula heterodimérica. FcP1 é uma proteína de fusão dimérica compreendendo a IgG1 hinge humana, domínios CH2 e CH3.

5 Glicoformas G2 foram preparadas submetendo amostras IgG em tampão MES de 100 mM (pH 7,0) (~10 mg em 1,0 mL de tampão) a 50 mil unidades de β 1,4GT, 5 μ moles de UDP-Gal, e 5 μ moles de $MnCl_2$ a 37°C por 24 horas. Outra alíquota de enzima e UDP-Gal foi adicionada e a mistura
10 foi incubada por 24 horas adicionais a 37°C. As amostras IgG regalactosiladas foram purificadas usando uma coluna de proteína A HiTrap. Os oligossacarídeos foram liberados por PNGase F e caracterizados por MALDI-TOF-MS e por HPLC como descrito abaixo.

A glicoforma G2S2 foi feita trazendo amostras IgG para 100 mM
15 de tampão MES (pH 7,0) (~10 mg em 1,0 mL de tampão) usando colunas NAP-5 de acordo com os fabricantes sugeridos no protocolo. A esta solução foram adicionados 50 mil unidades cada de β 1,4GT e α 2,3ST e 5 μ moles cada de UDP-Gal, CMP-Sia (isômero NANA), e $MnCl_2$. A mistura foi incubada a 37°C. Após 24 horas, outra alíquota de enzimas foi adicionada junta-
20 mente com açúcares de nucleotídeo e a mistura foi incubada por 24 horas adicionais a 37°C. A glicoforma G2S2 de amostras IgG foram purificadas como descrito acima. Para um lote Ab1 G2S2 particular, Ab1 G2S2(lo), o ácido siálico que foi originalmente anexado foi subsequentemente perdido durante armazenamento, possivelmente devido à uma sialidase de contami-
25 nação. Análises mostraram que apenas 30% dos oligossacarídeos Fc em Ab1 G2S2(lo) continham ácido siálico, enquanto ~95% dos oligossacarídeos em Ab1 G2S2(hi) continham ácido siálico.

As estruturas de glicanos nas preparações Ab foram analisadas por vários métodos. Para realizar análise MALDI-TOF-MS de IgG Abs intac-
30 tos, amostras IgG foram trazidas para 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,0 e a concentração ajustada para ~1 mg/mL de tampão. Cerca de 2 μ L de solução IgG foram misturados com 2 μ L de solução matriz (a solução matriz foi prepa-

rada dissolvendo 10 mg de ácido sinapínico em 1,0 ml de 50% de acetonitrila em água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) e 2 ml desta solução foram carregados para o alvo e permitidos para secagem a ar. MALDI-TOF-MS foi adquirido usando um instrumento Voyager DE de Applied BioSystems (Foster City, CA).

Para realizar análise MALDI-TOF-MS de Glicanos de Fc liberados, amostras IgG (~50 µg), antes e após reações de glicosilação *in vitro*, foram digeridas com PNGase F em 10 mM de tampão Tris-HCl (50 µl) pH 7,0 por 4 horas a 37°C. A digestão foi parada acidificando a mistura de reação com 50% de ácido acético (~ 5 µl) e então passada através de coluna de resina de troca catiônica como anteriormente descrito (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000). Essas amostras contendo uma mistura de oligossacarídeos ácidos ou neutros foram analisadas por MALDI-TOF-MS nos modos de íon positivo e negativo, como descrito em (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000) usando um instrumento Voyager DE de Applied BioSystems (Foster City, CA).

Análise HPLC de Glicanos de Fc foi feita digerindo amostras IgG (~50 µg) em 10 mM de tampão Tris-HCl (~50 µl) pH 7,0 com PNGase F a 37°C por 4-8 horas. Derivatização dos oligossacarídeos liberados com ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico) foi realizada como descrito (ver Anumula KR, Anal Biochem. 2000 Jul 15;283(1):17-26). Resumidamente, uma solução de 4% de acetato de sódio 3H₂O (p/v) e 2% de ácido bórico (p/v) em metanol foi preparada primeiro. O reagente de derivatização foi em seguida preparado dissolvendo ~30 mg de ácido antranílico (Aldrich) e ~20 mg de cianoborohidreto de sódio (Aldrich) em 1,0 ml de solução de metanol-acetato de sódio-borato. Oligossacarídeos derivados de IgG (<3 mmols em 20-50 µl de água) foram misturados com 0,1 ml da solução reagente do ácido antranílico (AA) em frascos de polipropileno de 1,6 ml congelados rosqueados com anéis em "O" (Sigma) e enroscados bem apertado. Os frascos foram aquecidos a 80°C em um forno ou bloco de aquecimento (Reacti-Therm, Pierce) por 1-2 horas. Após resfriar os frascos à temperatura ambiente, as amostras foram diluídas com água para trazer o volume para ~0,5 ml. Oligossacari-

deos derivatizados foram purificados usando colunas NAP-5.

EXEMPLO 2: LIGAÇÃO A RECEPTORES Fc CELULARES DE BAIXA AFINIDADE

5 Dos muitos tipos de receptores Fc em células efectoras, Fc_{gama} tipos II e III são considerados receptores de afinidade baixa ou intermediária. Geralmente, ligação monomérica pode ser de uma afinidade muito baixa para ser detectada ou em níveis muito baixos., por exemplo, ligação IgG monomérica Fc_{gama} tipo IIA é mais difícil de medir. Esses receptores funcio-

10 nam para ligar complexos imunes que devido à sua natureza de ligação multivalente mais avívda, presumivelmente devido à uma taxa baixa do complexo.

Células K562 humanas, que expressam FcγRIIA como o único receptor Fcγ, foram usadas em dois tipos de ensaios de ligação para testar se variações em conteúdo de ácido siálico no glicano Fc afeta ligação a seu

15 receptor humano de baixa afinidade Fcγ. Para obter avidéz suficiente de ligação a FcγRIIA, que tem baixa afinidade para IgG monomérico, complexos imunes foram preparados misturando Abs de teste anti-TNF com TNF homotrimérico em uma razão molar de 2:1, uma razão que foi mostrada para resultar em quantidades de vestígios de Ab livre ou TNF livre. A dependência

20 em complexos imunes foi ilustrada quando Ab2 radiorrotulado sozinho ligante-se a células K562 não foi detectável em concentrações até 1 ug/ml mas complexos Ab2:TNF mostraram ligação significativa a 0,02 ug/ml (dados não mostrados).

Formato de Ligação de Competição:

25 Dois testes de complexos imunes de IgG foram preparados, um complexo rotulado contendo o anticorpo IgG humano com especificidade relevante complexado para uma região anti-V específica de Ab ou Ab5 não humano. Para criar o complexo rotulado, um Ab monoclonal quimérico com regiões V de hamster com IgG1 humano e regiões constantes capa de cadeia leve foi iodado usando reagente IODO-GEN como anteriormente descrito

30 (Knight et al., 1993). Um Ab IgG2a monoclonal de rato específico para o idiótipo de região V do quimérico hamster-humano, foi em seguida mistura-

do em uma razão molar de 1:1 em PBS por 30 min para permitir formação de complexos imunes radiorrotulados. O anti-Ig de rato foi mostrado como não contribuindo para ligação FcγRIIA direta como quando complexos foram feitos com o quimérico de hamster-humano desglicosilado, pouca ligação ocorreu: enquanto, complexos com Ab quimérico não modificado mostrou níveis baixos de ligação (dados não mostrados). Em adição, não existiu nenhuma reatividade cruzada detectável entre os agentes usados para preparar os complexos imunes separados que puderam indicar que um complexo imune pode ligar-se a outro complexo imune (dados não mostrados).

Para os complexos de teste, variantes de ácido siálico de Ab1 foram misturadas com homotrîmero TNF humano em uma razão molar de 2:1 (mostrado em análise de espalhamento leve para resultar em um Ab muito pouco ligado mais TNF não ligado) em PBS à temperatura ambiente por 30 minutos. Em um conjunto de experimentos, complexos de variantes naturais de Ab1 com 20 e 29 por cento de ácido siálico foram comparados uns com os outros. Em um segundo conjunto de experimentos, complexo, Ab1 –29:TNF foi comparado ao complexo Ab1 –43: TNF de preparação melhorada com coluna de lectina em ambos os casos, o complexo de controle foi Ab1-Gno:TNF onde o anticorpo foi enzimaticamente tirado do glicano.

Células K562 humanas foram cultivadas a 3×10^5 células/poço em placas de 96 poços em IMDM, 5% FBS. Uma quantidade fixa do complexo de anticorpo radiorrotulado foi adicionada a quantidades variáveis do complexo de anticorpo de teste e a mistura combinada adicionada às células K562 tal que cada poço continha uma concentração final de 0,1 µg/ml de complexo de anticorpo iodado. As placas foram incubadas por 16-18 horas a 4°C, após o que um Ab de ligação removido por lavagem 3 vezes com IMDM, 5% de FBS, e o número de contagens ligadas às células determinado usando um contador gama.

Resultados:

Quantidades aumentadas complexos imunes de competidor não rotulado inibiram significativamente ligação pelo complexo imune radiorrotulado. As variantes de ácido siálico, Ab1 não modificada (29% sialilada) e Ab1

MAAB (43% sialilada) mostraram que o complexo com Ab mais altamente sialilado foi requerido a 5 a 10 vezes concentrações mais elevadas do que o complexo Ab1 menos sialilado a fim de produzir a mesma extensão de ligação a FcγRII (Figura 4A). Para as variantes naturais de Ab1 diferindo por 9% de conteúdo de ácido siálico (20 v 29), a diferença foi de cerca de 4 vezes mais avides para a preparação menos sialilada (não mostrado). Assim, a presença da forma de isômero NGNA de ácido siálico, como resultado de expressão recombinante em uma célula hospedeira de mieloma de murino, neste IgG1 humano reduziu a avides dos complexos imunes para FcγRII humano.

Ligação de Complexos Imunes às Células K562:

Amostras de teste Ab1 foram misturadas com TNF humano rotulado em ^{125}I em uma razão molar de 2:1 fixa, e em seguida variando quantidades do complexo imune resultante adicionado a células 3×10^5 K562 em uma placa de cultura de 96 poços. Uma comparação de complexos Ab1 G2:TNF (Ab não sialilado) vs complexos Ab1 G2S2(hi):TNF (Ab completamente sialilado) mostrou que o Ab completamente sialilado ligado com muito menos avides, com a variante altamente sialilado sendo requerido a concentrações 10 vezes maiores do que a variante assialilada para alcançar o mesmo grau de ligação (Figura 4B). Esses resultados indicam que a presença do isômero NANA de ácido siálico, introduzido por modificações enzimáticas *in vitro*, reduziu a avides do anticorpo para FcγRII humano que poderia ser atribuível para uma redução na afinidade de ligação ao alvo (TNF), desse modo fazendo com que os complexos Ab:TNF sejam menos estáveis, reduzindo a afinidade da região constante para o receptor Fc, ou ambos.

Ligação de Ab a FcγRIIIa Celular:

Para analisar ligação de Ab a FcγRIIIa em células assassinas naturais (NK), PBMCs humanos foram isolados como descrito acima, e as células NK foram isoladas de PBMCs por armazenamento de célula magnética usando um Kit de Isolamento de Células NK Cell (Miltenyi Biotec). Células NK foram cultivadas durante a noite em placas de 96 poços a 1×10^5 células por poço em meio DMEM com 10% de FBS a 37°C com 5% de CO₂.

mAb Anti-Fc γ RIIIa 3G8²² (BD Biosciences Pharmingen) foi rotulado com ¹²⁵I usando tubos de Iodogen (Pierce) para uma atividade específica de 11 μ Ci/ μ g. O mAb 3G8 indicado foi pré-misturado com quantidades variáveis de Ab de competidor não rotulado em DMEM, 10% de FBS e a mistura Ab adicionada a células NK para uma concentração final de 0,3 μ g/ml 3G8 iodado. Células foram incubadas à 4°C por 16 h e em seguida IgG ligado removido por lavagem 4 vezes com PBS. O número de CPMs ligados às células foi determinado usando um contador gama.

Células U-937 (sem pré-tratamento para melhorar expressão de Fc γ R) que foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, piruvato de sódio a 1 mM, e 10% de FBS (meio U-937) foram cultivadas em placas de 96 poços para ter 3 X 10⁵ células por poço em 50 μ l de meio U-937. Ab2 (IgG1 humano) foi rotulado com ¹²⁵I para uma atividade específica de 17 μ Ci/ μ g. O Ab Ab2 iodado foi pré-misturado com quantidades variáveis de amostras Ab2 de competidor não rotulado em meio U-937. 50 μ l da mistura Ab foram então adicionados a 50 μ l de células U-937 para ter uma concentração final de 0,2 μ g/ml de Ab3 iodado em todos os poços. Células foram incubadas à 4°C por 16 h e o Ab ligado foi removido por lavagem três vezes com meio U-937. O número de CPMs ligados às células foi determinado usando um contador gama.

Para testar se variantes Ab mostram afinidade diferente para Fc γ RIIIa, células NK recentemente isoladas foram isoladas de doadores saudáveis humanos e usadas em experimentos de ligação de competição envolvendo mAb 3G8 radiorrotulado, um Ab anti-Fc γ RIIIa que compete para ligação com Fc, e Abs não rotulados como competidores. Abs livres não complexados foram usados em vez de complexos imunes (que geralmente mostraram ligação muito maior a Fc γ RIIIa) de modo que os resultados não seriam confundidos com diferenças na estabilidade de complexos imunes solúveis propriamente ditos, que podem ser influenciados por conteúdo de ácido siálico Fc (dados não publicados). Os resultados mostraram que a variante natural sialilada de Ab1, Ab1-29, teve uma afinidade reduzida para Fc γ RIIIa nas células NK, sendo requerido em concentrações 4 vezes maio-

res do que Ab1-20 para alcançar o mesmo grau de ligação (Figura 5A). Existiu uma diferença similar com as variantes naturais de Ab5, onde Ab5-26 foi requerido em concentrações 5 vezes mais altas do que Ab5-0 para competir contra mAb 3G8 para a mesma extensão (Figura 5B). Resultados similares foram obtidos em cada experimento ao usar células NK de pelo menos dois outros doadores (dados não mostrados; alótipo FcγRIIIa não determinado). Esses resultados mostraram que níveis mais elevados de sialilação podem reduzir afinidade IgG para FcγRIIIa e, portanto, quase que certamente contribuíram para a redução observada na atividade ADCC.

Quando o mesmo experimento foi feito com os pares de variantes derivadas por fracionamento de lectina, entretanto, as variantes mais sialiladas foram vistas para ligar FcγRIIIa assim como, e talvez levemente melhor, do que as variantes menos sialiladas (Figuras 5C e 5D). As razões para os diferentes resultados com os dois pares de variantes naturais e dois pares de variantes derivadas de lectina não são mostradas, mas uma boa possibilidade é que existem diferenças nas localizações dos resíduos de ácido siálico que estão presentes.

EXEMPLO 3: ENSAIOS ADCC IN VITRO

As células-alvos para o Ab anti-TNF compreendem uma linhagem de célula de mieloma de camundongo Sp2/0 que estavelmente expressa em sua superfície TNF humano recombinante que permanece em uma forma de transmembrana devido à introdução de uma deleção de aminoácidos a 1-12 de TNF maduro (Perez et al., 1990). Células K2 foram cultivadas em meios de Iscove contendo FBS inativado aquecido, 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, e MHX. Os meios de cultura e suplementos foram comprados de Gibco (Invitrogen). As células foram passadas 1:5 a cada 2-3 dias. No dia do ensaio, as células K2 foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBS. As células foram ajustadas para cerca de 1×10^6 células/ml com o meio de cultura e 15 microlitros de reagente de rotulação fluorescente BATDA (em Delfia EuTDA Cytotoxicity Reagent Kit, Perkin-Elmer Life Sciences) foram adicionados a 5 ml de células (Blomberg et al., 1996). As células foram incubadas por 30 minutos a

37°C, em seguida lavadas duas vezes com PBS a 1000 rpm, 5 min. Imediatamente antes de misturar com células efetoras PBMC, células-alvos foram centrifugadas e ressuspensas em 2×10^5 células/ml em meios de Iscove contendo 1% de BSA.

5 Células efetoras PBMC foram isoladas de doadores saudáveis após coleta de sangue em tubos heparinizados, e diluindo duas vezes com PBS. Trinta ml de sangue diluído foram colocados em camada no topo de 15 ml de Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Sweden) em um tubo cônico de 50 ml e centrifugado a 1500 rpm, 30 min à temperatura ambiente (RT). A interface (camada de tampão) contendo PBMCs foi coletada e lavada duas vezes
10 com PBS e centrifugada a 1200 rpm, 10 min, TA. As células foram ressuspensas em meios de Iscove contendo 5% de FBS aquecido inativado, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 0,1 mM de aminoácidos não essenciais. PBMCs foram ativados por aproximadamente 4 horas a 37°C,
15 5% de CO₂ incubando em discos de cultura de tecido de 100 mm (Corning) que foram revestidos com OKT3 (10 ug/ml em PBS, Ortho Pharmaceutical) durante a noite a 4°C e enxaguados com PBS. PBMCs foram coletados, lavados uma vez com meios de Iscove contendo 1% BSA; revestidos e res-suspensos a aproximadamente 1×10^7 células/ml.

20 Amostras de teste de Ab1, incluindo Ab1 Gno de varinte de controle negativo, foram diluídas em série em meios BSA de Iscove a 1%. Cinquenta microlitros de células-alvos (~10,000) e 100 microlitros de anticorpo foram adicionados a uma placa de 96 poços de fundo redondo (Corning). Cinquenta (50) microlitros de células efetoras (~500,000 cells) foram adicionados à mistura, e a placa foi centrifugada a 1000 rpm por 5min, TA. A razão
25 de E:T foi usualmente 50:1, entretanto, 35:1 foi algumas vezes usada. Para fluorescência de fundo, cabidades foram incubadas com células efetoras, células-alvos e meios. Para fluorescência máxima, 10 microlitros de solução de lise (de Delfia EuTDA Cytotoxicity kit) foram adicionados a poços de fundo.
30 Para o ensaio ADCC, células foram incubadas à 37°C, 5% CO₂, por aproximadamente 2 horas. 20 microlitros de sobrenadante foram transferidos para uma placa de fundo plano de 96 poços (Corning). 200 microlitros de

solução Europium (Delfia EuTDA Cytotoxicity Kit) foram adicionados e a placa foi colocada em um agitador de placa por 10 minutos à TA. A fluorescência foi medida no fluorômetro de tempo, Instrumento EnVision (Perkin-Elmer Life Sciences). A porcentagem de lise específica em cada amostra foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de liberação específica = $\frac{[\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}]}{[\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea}]} \times 100$.

As avaliações iniciais dos efeitos de ácido siálico focaram em atividade ADCC *in vitro* dos dois pares de variantes naturais. Ab1-29 e Ab1-20 foram incubados em concentrações variáveis com células-alvos de expressão de Ag1, rotuladas com Europium. Como mostrado na figura 6A, existiu uma clara diferença na atividade citotóxica, em que Ab1-29, com níveis mais elevados de sialilação Fc, foi requerido em aproximadamente concentrações 7 vezes mais altas do que Ab1-20 a fim de acionar lise celular na mesma extensão. Os resultados mostraram que o sublote de Ab1 que foi enriquecido com glicoformas sialiladas, Ab1 MAAB, foi menos potente do que PBS de Ab1. Aproximadamente 3 vezes mais do material MAAB-43% de Ab1 foi requerido para alcançar a mesma quantidade de lise como na amostra PBS-29% de Ab1. Experimentos com células-alvos que expressam Ag5 mostraram o mesmo padrão para o par de variantes naturais de Ab2. A fim de alcançar o mesmo grau de lise celular que a variante Ab2-0 sem ácido siálico detectável, uma concentração de aproximadamente 6 vezes mais elevada de Ab2-26 foi requerida (como mostrado na figura 6B). assim, o efeito de variação de glicosilação natural nesta medida de ADCC não é Ab ou alvo específico.

Em um experimento representativo para comparar a atividade de sublotos do Ab1 que difere em seu conteúdo de ácido siálico seguindo um fracionamento baseado em lectina, Ab1 MAAB (43% sialilado) foi comparado ao lote de Ab1 não modificado do qual ele foi derivado (Ab1 PBS). Em um segundo experimento para comparar sublotos de Ab1 que diferiram em conteúdo de ácido siálico, Ab1 WGAT (29% sialilado), Ab1 WGAR (40% sialilado), e Ab1 WGAB (32% sialilado) foram comparados um com o outro.

Os resultados do ensaio também demonstraram uma relação inversa entre conteúdo de ácido siálico e potência no ensaio ADCC independente da maneira na qual o Ab foi preparado (Fig 6C). Isto é, Ab1 WGAT, que contém cerca da mesma quantidade de ácido siálico que o Ab1 não modificado, mostrou a mesma atividade que o Ab1 não modificado. Entretanto, frações preparadas com WGA perderam potência com o aumento do conteúdo de ácido siálico (Figura 6C).

Em um experimento, duas amostras com profundas diferenças no conteúdo de ácido siálico foram comparadas, Ab1 G2 enzimaticamente modificado (0% sialilado) e Ab1 G2S2(hi) (~95% sialilado). PBMCs frescos foram isolados por centrifugação de densidade em Ficoll-Paque. 5×10^5 de PBMCs em um volume de 100 ml foram pré-incubados por aproximadamente 10 minutos com quantidades variadas de Ab1, Ab1 G2S2(hi) não tratados (completamente galactosilado e sialilado), ou Ab7, um Ab combinado com isótipo de controle negativo. Células K2 expressando superfície ligada a TNF humano recombinante foram usadas como alvos rotulando com 200 mCi de ^{51}Cr . As células rotuladas foram adicionadas à mistura PBMC/Ab, centrifugadas a 1000 rpm por 1 minuto, e incubadas à 37°C por 4 horas. Este tempo de incubação (4 horas) é conhecido por revelar primeiramente lise celular induzida por células NK (dentro da população de células PBMC), que expressam FcγRIIIA, em vez de por macrófagos, que geralmente expressam FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A), e FcγRIIIA (CD16A). O número de radioatividade nos sobrenadantes de células foi em seguida determinado usando Topcount. Os resultados mostrados (Figura6D) são representativos de dois experimentos independentes feitos usando PBMCs de diferentes doadores e mostraram mudança em potência de lise celular mais do que 10 vezes entre Ab que é completamente sialilado e um que é quase dessialilado.

Outros pares de preparação Ab foram também comparados no ensaio ADCC. Frações de lectina WGA preparadas de Ab2 galactosilado foram avaliadas em ensaios ADCC usando células-alvos de expressão de Ag2. Novamente, o material sialilado mais elevado foi menos ativo, embora existisse apenas uma diferença de 4 vezes em seus valores EC_{50} em vez de

sua diferença drástica em conteúdo de ácido siálico (5% vs 67%). Por comparação, as frações de lectina WGA feitas a partir de Ab1 mostraram que 41% de variante sialilada necessitando de ser em aproximadamente 6 vezes concentrações mais elevadas do que 29% de variante sialilada para alcançar o mesmo grau de lise celular.

Esses resultados para todos os três Abs testados consistentemente mostraram que níveis mais elevados de ácido siálico Fc foram associados com atividade ADCC reduzida. Embora não quantitativas, as diferenças entre a mudança de magnitude em atividade ADCC e em conteúdo de ácido siálico das preparações Ab, existiu uma relação consistente dentro de um quadro de quatro variantes Ab1, onde os valores EC_{50} foram tipicamente 0,3 ng/ml, 2 ng/ml, 2 ng/ml e 10 ng/ml para Ab1-20, Ab1-29, Ab1-WGA-29, e Ab1-WGA-41, respectivamente. Os resultados com as frações de lectina também confirmaram que preparações Ab sialiladas contêm espécies moleculares com níveis variáveis de atividade ADCC. É digno de nota que, com a exceção de Ab3-0 e Ab3-26, as variantes analisadas aqui tenderam a não mostrar diferenças no nível máximo de lise alcançada.

Uma vez que este método de medir atividade ADCC é primariamente mediado por células BK positivas para $Fc\gamma RIIIA$, os dados implicam que, enquanto a presença de ácido siálico no oligossacarídeo Fc melhora à ligação a $Fc\gamma RI$, sua presença significativamente diminui ligação a $Fc\gamma RIIIA$.

EXEMPLO 4: LIGAÇÃO A RECEPTOR Fc CELULAR DE ALTA AFINIDADE

A ligação de Abs de teste que diferiram em conteúdo de ácido siálico a receptor Fc humano de alta afinidade, $Fc\gamma RI$ (CD64), foi medida usando um formato de ligação de competição em células U-937, uma linhagem de célula monocítica humana. Células U-937 foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, e 10% de FBS em frascos T e mantidas em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37°C. Ab2, um Ab quimérico IgG1 de camundongo/humano, foi iodado usando tubos de iodação pré-revestidos IODO-Gen para uma atividade específica de 17,2 mCi/mg. Células U-937 foram ressuspensas em 6×10^6 células/ml com meios de cultura frescos, e em seguida selecionadas em placas de cultura

de tecido de 96 poços Millipore com filtros em uma densidade de 3×10^5 células por poço. As células não foram pré-tratadas para induzir expressão de FcγR. Ab2 iodado foi pré-misturado com quantidades variáveis de competidor Mab não rotulado (as amostras de teste) usando o meio de cultura como diluente, em um volume de 50 μl. As misturas foram em seguida adicionadas a 50 μl de cultura de células U-937 para dar uma concentração final de Ab2 iodado de 0,2 ng/ml. As células foram em seguida incubadas à 4°C por 16 horas. IgG não ligado foi removido lavando com meio e aspirando três vezes usando um sistema a vácuo de placa. O número de contagens ligadas às células foi determinado usando um contador gama.

Figura 7A mostra que, comparado a Ab1 G2 (sem ácido siálico), Ab1 G2S2(hi) (~95% sialilado) ligado a FcR de alta afinidade (CD64) em células U-937 com 5 a 10 vezes mais afinidade, isto é, Ab1 G2S2(hi) foi requerido em apenas um quinto para um décimo da concentração para dar o mesmo grau de inibição de ligação de Ab2 iodado. Ab1 G2 não mostrou nenhuma diferença detectável de Ab1 não tratado (dados não mostrados), o último sendo uma mistura heterogênea de diferentes glicoformas, a maioria das quais contendo menos galactose (isto é, glicoformas G0 e G1) do que a amostra Ab1 G2.

Figura 7B mostra que dois diferentes lotes de Ab3 que diferem na quantidade de espécies de oligossacarídeo carregado (espécies contendo ácido siálico), sendo ou 2% do oligossacarídeo total 42%, similarmente mostra que o lote caracterizado como tendo conteúdo de ácido siálico mais elevado tem afinidade mais elevada para FcγRI.

Após observar a ligação reduzida a célula NK FcγRIIIa por preparações de anticorpo com conteúdo de ácido siálico mais elevado para dois pares de variantes de glicosilação natural de Ab1 e Ab5 (Exemplo 3, Figura 5A e B), a possibilidade que o efeito teve devido à repulsão eletrostática simples entre ácido siálico carregado negativamente e a superfície celular carregada negativamente foi considerada. Entretanto, o efeito inverso de conteúdo de ácido siálico na afinidade de ligação para o receptor FcγRI em células U-937 humanas não seguiu o mesmo padrão para Ab5 ou outros Abs

(dados não mostrados).

Deve ser notado que, enquanto duas amostras de Ab1 diferem na ausência/presença da forma NANA de ácido siálico, acredita-se que as duas amostras AB3 difiram na quantidade da forma NANA de ácido sílico (produzido em células hospedeira de camundongo).

EXEMPLO 5: MEDIÇÃO DE MEIA-VIDA DE SORO

No presente exemplo, uma proteína de fusão contendo Fc compreendendo um peptídeo N-terminal fundido a uma sequência de região variável de anticorpo e um hinge IgG1 humano, domínios CH2 e CH3 expressos em células de mieloma de camundongo foi tratada para formar a foram completamente sialilada (G2S2). A ratos cD1 normais fêmeas (4 por grupo de tratamento) foi dada uma injeção intravenosa de ou a forma não modificada do FcP1, que continha oligossacarídeos Fc que foram 5% sialilados, ou a versão completamente sialilada (~98% sialilado) foram injetadas separadamente em grupos de ratos CD1 fêmea de forma intravenosa. O sangue foi coletado por sangrias retro-orbitais e 1 hora, 5 horas, 24 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, e 21 dias, e em seguida a coleta de sangue terminal foi tomada por punção cardíaca de animais anestesiados com CO₂ no dia 28. O soro foi preparado a partir das amostras de sangue e a concentração de Fc humano no soro medida usando ELISA calorimétrico. Resumidamente, placas EIA de 96 poços foram primeiramente revestidas com anticorpos Fc anti-humanos de cabra policlonais. Diluições variadas das amostras de soro foram incubadas nas poços por 1 hora à temperatura ambiente. Proteína não ligada foi removida por lavagem, e Fc humano ligado detectado usando anticorpos IgG anti-humano de cabra conjugado por enzima, seguido se substratos coloridos apropriados.

Os resultados são mostrados na figura 8. A área calculada sob a curva (AUC) foi $95 \pm 1,6 \text{ dia} \cdot \text{ng/ml} \times 10^{-3}$ para anticorpo não modificado e $48 \pm 1,9 \text{ dia} \cdot \text{ng/ml} \times 10^{-3}$. isto mostrou que um grau mais elevado de sialilação no oligossacarídeo foi associado com uma taxa mais rápida de clareza em ratos normais.

Em um segundo experimento, camundongos normais foram inje-

tados com uma única dose de 3 mg/kg de Ab2 enzimaticamente modificado para ser ou completamente assialilado (G2) ou completamente sialilado (G2S2). Fc humano no soro foi monitorado e medido usando ELISA calorimétrico como descrito acima. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 9. Após um período de aproximadamente uma semana, o Ab2 G2S2 começou a ser clareado mais rapidamente a partir do soro dos camundongos e por 20 dia o Ab2 G2S2 que permaneceu no soro foi de aproximadamente 1000 vezes menos do que a concentração de Ab2-G2.

Clareza de Variantes de Ácido Siálico de Ab1 a Partir da Circulação Sistêmica em Camundongos:

Outra medição direta do efeito do conteúdo de ácido siálico foi feita quantificando a taxa de clareza de espécies de glicosilação individuais a partir do soro após injeção de uma amostra contendo uma mistura heterogênea de espécies de glicanos anexadas a um Ab1.

A mesma preparação glicosilada de forma heterogênea de Ab1 foi injetada i.p. em 18 camundongos Balb/c normais, 8-10 semanas de idade em uma dose de 20 mg/kg. O sangue foi coletado de 6 camundongos no dia 3, outros 6 camundongos no dia 14, e de 6 camundongos finais no dia 28. o soro foi preparado a partir de cada amostra de sangue e Ab1 repurificado a partir do soro usando uma coluna de afinidade anti-Id específica para regiões V Ab1. As estruturas dos glicanos Fc das amostras de Ab1 repurificadas foram em seguida analisadas por análise HPLC e a proporção relativa de várias glicoformas determinada como anteriormente descrito aqui.

Foi descoberto que a glicoforma galactosilada que não tem ácido siálico(G2S0) mantém sua abundância relativa durante um período de 4 semanas no camundongo, enquanto que as glicoformas Ab contendo glicanos com 1 ácido siálico(G2S1) e as glicoformas com 2 ácidos siálicos (G2S2) clarearam em uma taxa mais rápida. Assim, proteínas contendo Fc sialiladas têm uma meia-vida de soro menor do que composições assialiladas ou parcialmente sialiladas.

EXEMPLO 6: CONTEÚDO DE ÁCIDO SIÁLICO E AVIDEZ DE ANTICORPO

Os resultados descritos aqui suportam a teoria que uma mudan-

ça no conteúdo de ácido siálico do glicano Fc (hinge-CH₂-CH₃ dimerizado) irá impactar a proteína inteira. Com relação à bivalência de anticorpos e proteínas de fusão compreendendo um Fc glicosilado, os efeitos podem ser manifestados na avidéz da proteína para um alvo específico. Os expermen-

5 tos neste exemplo foram realizados para testar esta teoria e, adicionalmente, demonstram o efeito específico de conteúdo de ácido siálico na afinidade de ligação-alvo.

Ligação a Antígeno de Superfície Celular:

As mesmas linhagens de célula expressando Ag usadas nos

10 ensaios ADCC descritos acima foram usadas em ensaios de ligação para testar diferenças entre variantes de ácido siálico em sua avidéz de ligação de antígeno. Os ensaios foram realizados em um formato de competição, em que um dos Abs radiorrotulados (ou Ab1, Ab2, ou Ab5), mantido em uma concentração fixa, foi incubado com as células de expressão Ag na presença

15 de quantidades variáveis de Abs de teste não rotulados. Abs iodinados, preparados pelo método Iodogen, tiveram geralmente uma atividade específica de 10 uCi/ug.

As células que expressam TNF de superfície foram selecionadas em placas de cultura de tecido de 96 poços a 50,000 células por poço, e células que expressam Ag2a 180,000 células por poço, em meio IMDM com

20 5% de FBS. O Ab rotulado por ¹²⁵I foi pré-misturado com quantidades de titulação de Abs de teste e a mistura adicionada às células que expressam Ag apropriadas. As placas foram incubadas à TA por 2 horas para permitir ligação de Ab às células. As células foram em seguida lavadas três vezes

25 com IMDM, 5% de FBS para remover Ab não ligado, e o número de contagens ligadas às células determinado usando um contador gama.

Para variantes Ab5, células que expressam Ag5 foram selecionadas em placas de cultura de tecido de 96 poços a 186,000 células por poço em 50 µl de DMEM, 10% de FBS. Ab2 rotulado com ¹²⁵I foi pré-misturado

30 com quantidades de titulação de Ab de teste e 50 µl da mistura adicionada às células que expressam Ag. As placas foram incubadas à 4°C por 16 horas para permitir ligação Ab ao antígeno nas células. As células foram em segui-

da lavadas três vezes com DMEM, 10% de FBS para remover Ab não ligado, e o número de contagens ligadas às células determinado usando um contador gama. Amostras foram testadas em duplicatas ou quadruplicatas, e os resultados mostrados são representativos de 3 ou 4 experimentos independentes. A diferença na ligação entre essas amostras de teste foi significativa ($P < 0,0001$ para os gráficos a, c, e d) como determinado pela soma extra de quadrados de teste F.

Os resultados são mostrados nas Figuras 10A-D: ligação por células que expressam Ab1 a Ag1 radiorrotulados na presença de variantes naturais de Ab1 não rotulado como competidores (Figura 10A); ligação por células que expressam Ab5 a Ag5 radiorrotulado na presença de variantes naturais Ab5 não rotulados como competidores (Figura 10B); ligação por células que expressam Ab1 a Ag1 radiorrotulado na presença de variantes derivadas de lectina Ab1 não rotulado como competidores (Figura 10C); ligação por células que expressam Ab3 a Ag3 radiorrotulado na presença de variantes derivadas de lectina Ab3 como competidores (Figura 10D).

Ligação de Ab a Ligante de Fase Sólida:

TNF recombinante solúvel ou anti-I δ 2 foi revestido em placas EIA adicionando 50 μ l de Ag ou anti-I δ Ab a 1 μ g/ml em PBS a cada poço e incubando as placas a 4°C durante a noite. As poços foram lavadas e em seguida pré-tratadas com 50 μ l de 1% BSA, 0,125% gelatina em PBS por 1 hora à TA para minimizar ligação não específica. Ab1 rotulado com ^{125} I ou Ab rotulado com ^{125} I foi pré-misturado com quantidade de titulação das respectivas preparações Ab de teste em IMDM, 5% de FBS, e 50 μ l da mistura adicionada às poços revestidas alvo. A concentração final do Ab radiorrotulado foi 100 ng/ml em todas as poços. As placas foram incubadas à TA por 2 horas para permitir ligação de Ab aos alvos revestidos. As poços foram lavadas para remover Ab não ligado e o número de contagens ligadas determinado usando um contador gama.

Ligação de Abs Revestidos com Placas a Antígeno Solúvel:

Placas de 96 poços foram revestidas com variantes de ácido siálico de Ab1 ou Ab3 e em seguida incubadas com quantidades variáveis

de antígeno solúvel radiorrotulado como segue: (a) ligação de Ag1 solúvel radiorrotulado a variantes naturais Ab1 revestidas com placas, (b) ligação de Ag1 solúvel radiorrotulado a variantes fracionadas de lectina Ab1 revestidas com placa, e (c) ligação de Ag3 solúvel radiorrotulado a variantes fracionadas com lectina Ab3 revestidas com placa. Incubações paralelas com Ag radiorrotulado e Ag não rotulado com excesso de 100 vezes foram feitas para determinar ligação não específica. Amostras foram testadas em triplicatas. Variantes Ab2 não foram analisadas devido à inviabilidade de Ag2 solúvel.

Análises Estatísticas:

A diferença na potência entre variantes de anticorpo foi analisada por comparação das curvas usando regressões logísticas de parâmetro 4 com um mínimo comum, máximo é inclinação seguindo um teste preliminar para inclinação e faixa dado um plateau comum para uma concentração zero (isto é, sempre assumindo serem testar um "botão" comum para aumentar curvas e topo comum para diminuir curvas). Testagem significativa foi feita com a soma extra de Quadrados de teste F em Prism v4 GraphPad. Um valor P de $< 0,05$ foi considerado como sendo significativo. Análises em CPM foram ponderadas inversamente por CPM^2 porque o desvio padrão de CPM aumenta proporcionalmente em sua média (isto é, o coeficiente de variação CPM, CV é não relacionado à média).

Resultados

Experimentos de ligação a antígeno realizados em um formato de competição com as mesmas células-alvos que expressam Ag que foram usadas nos ensaios ADCC inesperadamente mostraram Ab1-29 para consistentemente ligar antígeno de superfície com cerca de 3 vezes menos afinidade do que Ab1-20 (Figura 10A). Ab5-26, em contraste, mostrou uma afinidade que foi indistinguível do Ab5-0 (Figura 10B). As mesmas análises realizadas com os dois pares de variantes derivadas de lectina mostraram resultados similares às variantes naturais de Ab1, isto é, o Ab1-WGA-41 sialilado mais elevado foi requerido em 4 a 6 vezes concentrações mais elevadas do que o Ab1-WGA-29 menos sialilado para alcançar o mesmo grau de ligação competitiva (Figura 10C), e o Ab2-GT-WGA-67 sialilado mais elevado foi

requerido em 4 a 6 vezes de concentrações mais elevadas do que o Ab2-GT-WGA-5 mesmo sialilado (Figura 10D).

Interessantemente, o mesmo padrão de ligação diminuída por variantes Ab1 e Ab2 com quantidades mais elevadas de sialilação foi também observado em experimentos analisando ligação a alvos (antígeno recombinante solúvel ou Ab anti-Id) que foram imobilizados em placas EIA de 96 poços (Figuras 11A e B). Esses resultados mostraram que as diferenças na extensão de sialilação Fc podem impactar ligação a antígeno bem como a Fc γ RIIIA, mas que a extensão de sialilação não impacta ligação de antígeno de todos os Abs.

A partir dos dados sobre ligação-alvo imobilizada, acredita-se que sialilação Fc aumentada pode servir para reduzir flexibilidade de região Ab. No caso de ligação de Ab1 e Ab2 a antígeno de superfície de célula, a flexibilidade de hinge reduzida poderia levar a ligação mais monovalente e ligação menos bivalente (alta avidéz) a antígeno dependendo do espaço de epítomos sobre o suporte sólido ou superfície de célula. A região de hinge de Ab5 pode também ter flexibilidade reduzida, mas flexibilidade pode não necessitar deste Ab para alcançar ligação máxima a Ag5.

A fim de diferenciar entre se aos efeitos de flexibilidade Ab ou mudanças de afinidade de ligação intrínscica foram afetados por sialilação Fc, a ligação de Ab a ligante solúvel foi testada como uma medida de afinidade de ligação puramente monovalente. Os resultados considerados mostraram que para os três pares de variantes de ácido siálico que mostraram diferenças na ligação a antígeno de superfície de célula, não existiram diferenças detectáveis observadas entre pares de variantes em sua ligação a alvos solúveis (Figuras 12 – C). tomados juntos, esses resultados demonstraram que diferenças na ligação a alvos imobilizados (superfície de célula ou revestida por placa) não foram devido à diferenças na afinidade intrínscica entre cada braço Fab e o alvo. Portanto, as diferenças entre as variantes de ácido siálico de Ab1 e Ab2 em sua ligação a alvos imobilizados é devido à diferenças na extensão de ligação bivalente às células.

EXEMPLO 7: PREPARAÇÃO DE UM VETOR PARA SECREÇÃO DE SIA-

LIDASE

Montagem de Plasmídeo de Expressão de Sialidase:

Uma sequência de ácido nucleico que codificado domínio catalítico da sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*, resíduos 40 a 535 do número de acesso GenBank AY934539, foi sintetizada com base naquela sequência. O gene sintetizado (SEQ ID NO: 2) que codifica a sequência de sinal de hormônio de crescimento humano-fusão de domínio catalítico *Arthrobacter ureafaciens* (SEQ ID NO:1 com uma sequência de sinal como os primeiros 26 aminoácidos e o domínio catalítico os 494 aminoácidos restantes) foi clonado em plasmídeo p2815 usando sítios de restrição exclusivo BamH I e Not I. Este plasmídeo possui um promotor CMV, sequência de codificação para sequência de sinal de hormônio de crescimento humano para afetar secreção, e um gene de resistência à neomicina para seleção estável. A sequência de codificação para o domínio catalítico de enzima ligada a sequência de codificação de inal hGH (SEQ ID NO: 1) foi verificada por digestão e sequenciamento de enzima de restrição.

Transfecção Transiente e Estável:

Para transfecção transiente, células HEK293 foram transfectadas com 15 ug de plasmídeo purificado p3629 ou plasmídeo de controle (vetor vazio) usando Lipofectamina 2000. Dna de plasmídeo e 90 uL de Lipofectamina 2000 foram diluídos em Optimem, combinados e em seguida incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. O coquetel de transfecção foi em seguida adicionado a 70% de células HEK293 confluentes em meios de crescimento durante a noite. No dia seguinte, os meios de crescimento foram recolocados com meios 293SFM, e as células incubadas por 5 dias para coleta e análise do meio. Para transfecção estável, células C168M foram eletroporadas com 10 ug de p3629 que foi linearizado por digestão de restrição com Bg1 II. As células transfectadas foram mantidas em meios de crescimento com 700 ug/mL de antibiótico Geneticina para selecionar transfectantes estáveis. Resistência a clones de antibiótico foram expandidas, e ensaiadas para sialidase.

Ensaio de Atividade de Sialidase:

Atividade de sialidase foi ensaiada usando ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico. Um ensaio fluorométrico em sobrenadantes de célula a partir de culturas de célula viáveis foi realizado misturando-o com 200 μ L de 150 μ M de ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico em 100 mM de tampão de fosfato de citrato, pH 6.5 a 37°C, seguido por adição de 2 mL de 0,5 M de Na_2CO_3 para parar a reação. Excitação foi realizada a 366 nm e emissão a 446 nm. Unidades fluorométricas foram normalizadas contra unidades celulares viáveis. Alternativamente, atividade de sialidase em meio de cultura foi determinada por incubação durante a noite de Remicado sialilado com meios de células transfectadas, e ensaiando ácido siálico como descrito abaixo.

Determinação de *ácido siálico*. Atividade de sialidase foi determinada por ensaio de remoção de ácido siálico a partir de anticorpo purificado após incubar com os sobrenadantes de cultura celular. Os oligossacarídeos ligados a N foram liberados tratando amostras IgG (0,05-05 mg em 0,1 ml) com PNGase F em 20 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,0 a 37°C por 4-6 h. Uma alíquota desta solução (~0,01 ml) foi passada através de uma coluna contendo resina de troca catiônica e analisada por MALDI-TOF-MS como descrito anteriormente(). A porção restante da amostra foi submetida à aminação reductiva com ácido antranílico e subsequente análise por HPLC como descrito por Anumula. Resumidamente, uma solução de 4% de acetato de sódio $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (p/v) e 2% de ácido bórico (p/v) em metanol foi preparado primeiro. O reagente de derivatização foi recém-preparado dissolvendo ~30 mg de ácido antranílico (Aldrich) e ~20 mg de cianoborohidreto (Aldrich) em 1,0 ml de solução de metanol-acetato de sódio-borato. Oligossacarídeos derivados de IgG (<3 mmols em 20-50 μ l de água) foram misturados com 0,1 ml da solução reagente de ácido antranílico (AA) em frascos congelados de 1,6 ml de rosca de polipropileno com anéis em "O" (Sigma) e enroscados apertados. Os frascos foram aquecidos a 80°C em um bloco de aquecimento (Reacti-Therm, Pierce) por ~1 hora. Após resfriar os frascos à temperatura ambiente, as amostras foram diluídas com água para trazer o volume para ~0,5 ml. Oligossacarídeos derivatizados foram purificados como descrito anteri-

ormente.

Purificação de Anticorpo:

Anticorpos recombinantes expressos a partir de células transfectadas estáveis foram purificados por cromatografia por afinidade de proteína A. Os sobrenadantes de células foram diluídos com tmapão de Proteína A 10X (0,2M de Tris, 1.4M de NaCl, 10mM de EDTA, pH8.5) a 1X, e purificados em uma coluna de proteína A de 1 mL. Os anticorpos diluídos foram dialisados em PBS, pH 7.2, antes de análise adicional.

Ensaio de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC):

Células alvo para ensaios envolvendo Ab1 e Ab3 foram preparadas em Centocor transfectando células de mieloma de camundongo Sp2/0 com forma de transmembrana de Ag1 e Ag3, respectivamente. As células expressando Ag1e expressando Ag3 foram cultivadas em FBS inativado de aquecimento contendo, 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais. Células aderentes expressando Ag2 foram obtidas de ATCC e cultivadas em meio DMEM contendo 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 0,1 mM de aminoácidos não essenciais. Todas as células foram passadas duas vezes por semana e mantidas em crescimento de fase log. Os meios e suplementos de cultura foram comprados de Gibco (Invitrogen).

No dia do ensaio, células-alvos que expressam Ag foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBS. Células alvo que expressam Ag2 aderente foram removidas com tripsina e lavadas duas vezes. As células foram ajustadas a 1×10^6 células/ml com meio de cultura e 15 μ l de BATDA ((Bisacetoximetil)-2,2':6'2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato) reagente de rotulação fluorescente (in Delfia EuTDA Cytotoxicity Kit, Perkin-Elmer Life Sciences; Blomber, K. et.al) foi adicionado a 5 ml de células. As células foram incubadas por 30 minutos a 37°C com agitação ocasional; em seguida lavadas duas vezes com os meios. Imediatamente antes de misturar as células efetoras, as células-alvos foram centrifugadas e ressuspensas em 2×10^5 células/ml em meios de cultura.

Células efetoras de células mononucleares de sangue periférico

(PBMC) foram isoladas a partir de sangue heparinizado de doadores saudáveis. Amostras de sangue foram diluídas com salina tamponada (PBS) e PBMC foram isolados por centrifugação gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (Amersham). Após centrifugação, PBMC foram coletados, lavados duas vezes, e mantidos durante a noite em meios de cultura a 37°C com 5% de CO₂. No dia seguinte, PBMC foram coletados, lavados e ressuspensos em meios a 1×10^7 células/ml.

Para os ensaios de citotoxicidade, diluições de anticorpo em 100 µl de meio de cultura foram adicionadas a uma placa de 96 poços de fundo redondo. Cinquenta µl de células efetoras e 50 µl de células-alvos rotuladas com BADTA foram adicionados às diluições em um efetor para uma razão de célula-alvo de 50:1. A placa foi centrifugada brevemente para colocar efetores e alvos em contato umas com as outras, e em seguida incubadas por 2 h a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Após incubação, 20 µl de sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo plano e 200 µl de alíquota de solução de intensificação Europium (in Delfia Cytotoxicity kit) foram adicionados a cada poço. Após agitar a placa por 10 min, fluorescência foi medida em um fluorômetro de tempo (EnVision instrument, Perkin-Elmer). A porcentagem da citotoxicidade específica foi calculada como (liberação experimental – liberação espontânea/liberação máxima – liberação espontânea) x 100. A liberação espontânea foi determinada incubando os alvos com meios em vez de células efetoras, e liberação máxima foi determinada incubando os alvos com 10 µl de solução de lise contendo digitonina (in Delfia EuTDA Cytotoxicity kit).

25 Resultados e Discussão

Vetor de expressão p3629 (Figura 13) foi construído e permitiu a expressão do domínio catalítico de sialidase A de *Arthrobacter ureafaciens* em célula de mamíferos. A sequência de codificação para a sequência líder de hormônio de crescimento humano foi operativamente ligada ao domínio catalítico da enzima a fim de forçar secreção extracelular da sialidase A. células HEK293 foram transientemente transfectadas com o plasmídeo de expressão, e o sobrenadante coletado para atividade de sialidase em anticorpo

- anti-TNF α purificado. Anticorpo foi incubado durante a noite com meios condicionados a partir de células p3629 transfectadas. Análise de HPLC de oligossacarídeos liberados a partir do anticorpo após incubação com o sobrenadante condicionado foi detectável em todos, exceto os glicanos liberados da linhagem de célula parenteral transfectada de controle. Portanto, atividade de sialidase estava presente apenas no sobrenadante de célula transfectada p3629, e não no sobrenadante transfectado de controle.

EXEMPLO 8: COEXPRESSÃO DE ANTICORPO E SIALIDASE

- O objetivo desses estudos foi gerar uma linhagem de célula hospedeira capaz de secretar uma enzima de sialidase nos meios de cultura, que poderia ser adicionalmente transfectada com sequência de codificação de anticorpo desse modo produzindo anticorpo glicosilado que seria desialilado. A linhagem de célula de mieloma de camundongo, C168M, que expressa um anticorpo foi transfectada com o vetor preparado no exemplo 7, p3629, e clones estáveis selecionados e peneirados por atividade de sialidase em sobrenadante. Como mostrado na tabela 2 abaixo, dos 17 clones ensaiados fluorometricamente (MFU) neste experimento, seis foram positivos para atividade de sialidase e a expressão de sialidase persistiu durante 6 semanas, indicando clones estáveis.

20 Tabela 2:

Clone Nº	Clones primários de atividade de sialidase (MFU)	6 semanas de atividade de sialidase (MFU)
WT		0
1	0	
2	0	
3	332	7536
4	0	
5	924	11544
6	0	
7	0	
8	0	
9	0	

Clone Nº	Clones primários de atividade de sialidase (MFU)	6 semanas de atividade de sialidase (MFU)
10	-0	
11	0	
12	6307	23140
13	57	519
14	26	
15	305	6408
16	0	
17	942	1765

5 Análise adicional de anticorpos purificados a partir de clones positivos de sialidase A por SDS-PAGE indicou que eles ainda expressam anticorpo intacto, e expressão da sialidase não afeta níveis de expressão. Análise de carboidrato dos anticorpos indicou que todos os clones continham menos do que 2% de ácido siálico, comparado ao anticorpo de célula hospedeira transfectada de não sialidase, que possuiu quase 15% de ácido siálico (tabela 3).

Tabela 3:

	Conteúdo de ácido siálico (%)	Conteúdo de Fucose (%)	ADCC EC40 (ng/mL)	Lise Max. de ADCC (%)
Controle transfectado	14,8	90	39,1	37,3
Clone 3	1,6	94	5,7	64,3
Clone 5	0,76	85	24,9	47,0
Clone 12	1,3	92	45,2	41,9
Clone 13	2,77	65	22,3	49,0
Clone 15	1,36	80	55,2	41,8
Clone 17	1,6	73	8,9	43,9

10 Os anticorpos de baixo ácido siálico provenientes de clones que sobre-expressam a sialidase foram ensaiados para atividade ADCC melhorada comparado a WT C168M (Figura 14). Como visto na tabela 3, algumas das amostras mostraram EC40s inferior e lise máxima mais elevada em se-

guida anticorpo anti-TNF α tipo selvagem, indicando que o conteúdo de ácido siálico menor teve um efeito nas propriedades biológicas deste anticorpo.

Um plasmídeo de expressão foi designado que irá secretar o domínio catalítico da enzima de sialidase A de *Arthrobacter ureafaciens* no meio de cultura de célula de mamífero. Esta enzima secretada é ativa em sobrenadantes de célula, e é capaz de remover resíduos de ácido siálico de oligossacarídeos ligados por N presentes na região Fc de anticorpos. Transfecção estável de linhagens celulares expressando anticorpos com este construto de expressão resulta em clones que secretam atividade de sialidase A em sobrenadantes de cultura, juntamente com anticorpo. Os anticorpos recuperados dessas culturas de célula contêm ácido que traduz para aperfeiçoamentos funcionais em atividade ADCC. Esses resultados sugerem que o método pode ser usado para gerar células hospedeira que expressam glicoproteínas e usado para criar culturas para glicoconjugados minimamente sialilados.

EXEMPLO 9: EXPRESSÃO CHO DE SIALIDASE

Células CHO são importantes células hospedeira para a fabricação de biofarmacêuticos. O plasmídeo p3629 (Figura 13) foi usado para estávelmente transfectar linhagem de célula CHO capaz de ser adicionalmente transfectado com um vetor para expressão de uma proteína terapêutica, tal como um anticorpo.

Células CHO (C1835A) foram transfectadas com 30 ug de p3629 que foi linearizado por digestão de restrição com Bg1 II usando FuGene 6 (Roche, Inc.). As células transfectadas foram mantidas em meios de crescimento com 700 ug/mL de antibiótico Geneticina (Invitrogen, Inc.) para selecionar transfectantes estáveis. Clones resistentes a antibiótico foram agrupados, expandidos e ensaiados para atividade de sialidase.

Atividade de sialidase em sobrenadantes de células a partir de culturas de células viáveis usando fluoroforo. A 200uL de sobrenadante de célula foram adicionados 150uM de ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetilneuramínico em 100mM de tampão citrato-fosfato, pH 6,5 a 37°C, seguido por adição de 2mL de 0,5M de Na₂CO₃ para parar a reação. A excita-

ção foi de 366nm e emissão de 446 nm. Unidades fluorométricas (FU) foram normalizadas dividindo leituras fluorométricas individuais para cada linhagem celular pelo número total de células viáveis. Atividade de sialidase no meio de cultura, como medida em FU, é mostrada na tabela 4.

5 **Tabela 4:**

Diluição	Semana 3		Semana 8	
	Controle	Transfectado	Controle	Transfectado
1	1880	4004	2547	7924
0,5	1742	2983	2276	4733
0,25	1566	2320	1967	2915
0,125	1558	2046	1960	2569
0,0625	1489	1990	1862	2139
0,03125	1513	1987	2036	2444

Como a atividade de sialidase em 3 semanas e 8 semanas após seleção permaneceu constante ou aumentou com o tempo, a expressão estável e a secreção da enzima de sialidase no sobrenadante de cultura foram confirmadas.

10 Será claro que a invenção pode ser praticada de outra maneira do que como particularmente descrito na descrição acima e exemplo. Várias modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos acima e, portanto, estão dentro do escopo das reivindicações anexas.

15 LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> CENTOCOR, INC.

<120> MÉTODOS E VETORES PARA GERAR IMUNOGLOBULINAS ASIALILADAS

<130> CEN5159PCT

<140> A ser atribuído

20 <141> 2007-12-26

<150> 60/882301

<151> 2006-12-28

<160> 2

<170> FastSEQ para Versão Windows 4.0

<210> 1

<211> 520

<212> PRT

<213> Arthrobacter ureafaciens

5 <400> 1

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ser

20 25 30

10 Pro Thr Leu Pro Pro Gly Ser Phe Ser Glu Thr Asn Leu Ala Ala Asp

35 40 45

Arg Thr Ala Ala Asn Phe Phe Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Leu

50 55 60

Gly Asn Asp Val Val Leu Ala Ala Trp Asp Gly Arg Pro Gly Ser Ala

15 65 70 75 80

Ala Asp Ala Pro Asn Pro Asn Ser Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp

85 90 95

Gly Gly Lys Thr Trp Gly Pro Val Gln Val Ile Ala Ala Gly His Val

100 105 110

20 Ala Asp Ala Ser Gly Pro Arg Tyr Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Ile

115 120 125

Tyr Asp Ala Glu Ala Asn Lys Val Phe Ala Phe Phe Val Tyr Ser Lys

130 135 140

Asp Gln Gly Phe Gly Gly Ser Gln Phe Gly Asn Asp Asp Ala Asp Arg

25 145 150 155 160

Asn Val Ile Ser Ser Ala Val Ile Glu Ser Ser Asp Ala Gly Val Thr

165 170 175

Trp Ser Gln Pro Arg Leu Ile Thr Ser Val Thr Lys Pro Gly Thr Ser

180 185 190

30 Lys Thr Asn Pro Ala Ala Gly Asp Val Arg Ser Asn Phe Ala Ser Ser

195 200 205

Gly Glu Gly Ile Gln Leu Lys Tyr Gly Pro His Lys Gly Arg Leu Ile

210 215 220
 Gln Gln Tyr Ala Gly Asp Val Arg Gln Ala Asp Gly Ser Asn Lys Ile
 225 230 235 240
 Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Val Thr Trp His Lys
 5 245 250 255
 Gly Ala Asn Val Gly Asp Arg Met Asp Glu Asn Lys Thr Val Glu Leu
 260 265 270
 Ser Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Ser Arg Asp Asn Ala Asn Arg Gly
 275 280 285
 10 Tyr Arg Lys Val Ala Val Ser Thr Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Gly Pro
 290 295 300
 Val Ser Gln Asp Thr Glu Leu Pro Asp Pro Ala Asn Asn Gly Ala Ile
 305 310 315 320
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Ala Gln Gly Ser Ala Asp Ala Lys Lys
 15 325 330 335
 Leu Ile Phe Thr Asn Ala Asn Ser Lys Thr Gly Arg Glu Asn Val Ser
 340 345 350
 Ala Arg Val Ser Cys Asp Asp Gly Glu Thr Trp Pro Gly Val Arg Thr
 355 360 365
 20 Ile Arg Ser Gly Phe Ser Ala Tyr Ser Thr Val Thr Arg Leu Ala Asp
 370 375 380
 Gly Lys Phe Gly Val Leu Tyr Glu Gly Asn Tyr Thr Asp Asn Met Pro
 385 390 395 400
 Phe Ala Thr Phe Asp Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Cys Ala Pro Leu
 25 405 410 415
 Ala Val Pro Ala Val Asn Ile Ala Pro Ser Ala Thr Gln Glu Val Pro
 420 425 430
 Val Thr Val Thr Asn Gln Glu Ala Thr Thr Leu Ser Gly Ala Thr Ala
 435 440 445
 30 Thr Val Tyr Thr Pro Ser Gly Trp Ser Ala Thr Thr Val Pro Val Pro
 450 455 460
 Asp Val Ala Pro Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Val Ala Leu Thr Ala

465 470 475 480

Pro Ala Asp Ala Ser Gly Pro Arg Ser Leu Asn Ala Ala Phe Thr Thr

485 490 495

Ala Asp Gly Arg Val Ser Gln Phe Thr Phe Thr Ala Thr Thr Pro Val

5 500 505 510

Ala Pro Gln Val Gly Leu Thr Ile

515 520

<210> 2

<211> 1563

10 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico encodificando o domínio catalítico da sialidase de Arthrobacter ureafaciens.

15 <400> 2

atggctacag gctcccgac gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg 60

cttcaagagg gatccgcccc cactccgccc aattcgccca cgcttccacc gggcagcttc 120

tctgaaacca atctggcggc cgaccgcaag gggcggaatt tcttctaccg gattcccgcg 180

cttacctacc ttggcaacga cgtggctcctt gcagcgtggg acggtcgccc gggttcggcg 240

20 gcggacgccc cgaacccgaa ctcgatcgtc cagcgccgaa gcacggacgg tggcaagacc 300

tgggggcccg tccaagtgat cgccgcaggc cagtcgccc atgccagcgg ccctcgatag 360

ggctacagcg atccctcgta catctacgac gcggaagcca acaaggtctt cgctttcttc 420

gtgtactcga aggaccaagg ctttggcggc agtcagttcg gcaacgacga cgcggaccgg 480

aacgtcattt cctccgcccgt catcgagtct tccgacgcgg gcgtgacatg gagccagccc 540

25 cgctcatca cctccgtcac caagccgggt accagcaaga ccaaccggc agccggcgac 600

gtccgctcca actttgcctc ctccggtgag ggcattccagc tcaaatacgg ccgcacaaag 660

ggcgtctca tccagcagta cgccggcgac gtgcggcaag ctgacggaag caacaagatc 720

caggcctaca gcgtctattc agacgatcac ggcgtcacgt ggcacaaggg tgccaacgtg 780

ggcgaccgga tggacgagaa caagactgtg gaactgtccg acggtcgggt cctgctcaac 840

30 tcccgggaca acgccaaccg gggctaccgc aaggtggccg tctccacgga cggcgagacc 900

acgtacggcc ccgtcagcca ggacacggaa ttgccggacc ctgccaacaa cgggtgcaatc 960

gcccgatgtg tccccaacgc ggcgcagggc tccgcagacg cqaagaaact gatcttcacc 1020

aacgcaaact ccaagaccgg ccgcgaaaac gtctcgggccc gggctctcctg tgacgacggc 1080
 gaaacctggc cgggcggtccg caccatccgt tccggcttct cggcctactc aacagtgacc 1140
 cgcctggcgg acggaagtt cggcgctctc tacgagggca actacacgga caacatgccc 1200
 ttcgccacct tcgacgacgc gtggttgaac tacgtctgcg ctcccttggc agtaccggca 1260
 5 gtcaacatcg ccccgagcgc aacgcaggag gttccggtga ccgtcactaa ccaggaagca 1320
 accacgcttt ccggcgcgac cgcaactgtc tatacgccgt cggggtggtc tgccaccacg 1380
 gtgcccggtgc ccgacgtcgc ccccggcgcg tccgtcacccg tgaccgttgc actgaccgca 1440
 ccggcggaag ccagtggccc gcgcagcctc aacgcggcat tcacgacggc ggatggccgg 1500
 gtttcgcagt tcaccttcac cgccaccacg cccgtggctc cgcaagtggg ccttaccatc 1560
 10 tag 1563

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prover uma atividade enzimática de sialidase em uma cultura compreendendo uma célula de mamífero construída para expressar uma molécula contendo Fc, compreendendo transfectar a célula
5 construída de mamífero com um vetor que codifica um polipeptídeo capaz de atividade enzimática de sialidase, em que o polipeptídeo é secretado na cultura juntamente com a molécula contendo Fc, desse modo a molécula contendo Glicanos de Fc pode ser atuada pela atividade enzimática de sialidase de polipeptídeo.
- 10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vetor codifica o domínio catalítico de enzima A. de sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula contendo Fc é um anticorpo e a linhagem de célula de mamífero é selecionada a partir do grupo consistindo em COS-1, COS-7, HEK293, BHK21,
15 CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0 ou Y3, mieloma, ou células de linfoma, ou qualquer derivado, célula imortalizada ou transformada dos mesmos.
4. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo
20 é um anticorpo anti-TNF α e a linhagem de célula é C168M.
5. Vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma enzima de sialidase, em que o vetor é capaz de expressar um polipeptídeo tendo atividade enzimática de sialidase em uma cultura de célula de mamífero expressando uma molécula contendo Fc.
- 25 6. Vetor, de acordo com a reivindicação 5, em que a enzima de sialidase é enzima A. de sialidase de *Arthrobacter ureafaciens* e a linhagem de célula de mamífero é selecionada a partir do grupo consistindo em COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0 ou Y3, mieloma, ou células de linfoma, ou qualquer derivado, célula
30 imortalizada ou transformada dos mesmos.
7. Vetor, de acordo com a reivindicação 5, em que o vetor compreende uma sequência de sinal, uma sequência de promotor, e uma resis

tência à antibiótico.

8. Vetor, de acordo com a reivindicação 7, em que a sequência de sinal é uma sequência de sinal de hormônio de crescimento humano, a sequência de promotor é uma sequência de promotor de CMV, e a resistência à antibiótico é neomicina.

9. Método para controlar as propriedades de uma molécula contendo Fc expressa em uma linhagem de célula, compreendendo reduzir a sialilação dos oligossacarídeos na região Fc transfectando a linhagem de célula com um vetor que codifica uma enzima de sialidase, em que a molécula contendo Fc expressa compreende uma quantidade reduzida de resíduos de ácido siálico.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que as propriedades da molécula contendo Fc controlado são a atividade da molécula para multiplicar proteínas-alvo localizadas; a afinidade para um ou mais dos receptores gama de Fc γ RI, Fc γ RIIA, e Fc γ RIIIA; atividade ADCC; ativação de macrófago ou monócito; e meia-vida de soro.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que o vetor codifica uma um domínio catalítico de enzima A. de sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula contendo Fc é um anticorpo e a linhagem de célula de mamífero é selecionada a partir do grupo consistindo em COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0 ou Y3, mieloma, ou células de linfoma, ou qualquer derivado, célula imortalizada ou transformada dos mesmos.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, em que o anticorpo é um anticorpo anti-TNF α e a linhagem de célula é C168M.

14. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula contendo Fc tem um domínio de ligação específico para um alvo, o alvo sendo um alvo imobilizado.

15. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula contendo Fc tem um domínio de ligação específico para um alvo, o alvo

presente é expresso na superfície de uma célula.

16. Proteína contendo Fc produzida ou alterada pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 9-15.

17. Proteína, de acordo com a reivindicação 16, em que a proteína é indicada para o tratamento de distúrbios relacionados a oncologia, doenças crônicas, ou doença infecciosa.

18. Proteína, de acordo com a reivindicação 17, em que a doença infecciosa envolve Limpeza de células opsinizada de anticorpo mediadas FcR ou partículas compreendendo um ou ambos dos vírus e bactérias e as doenças crônicas que requerem tratamento a longo prazo.

19. Proteína, de acordo com a reivindicação 17, em que a proteína compreende um anticorpo monoclonal expresso de forma recombinante, o anticorpo tendo glicofomas particulares enriquecidos usando cromatografia por afinidade de lectina.

20. Proteína, de acordo com a reivindicação 17, em que a proteína é um anticorpo monoclonal expresso de forma recombinante purificado usando um ou mais de cromatografia por afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, e cromatografia de exclusão por tamanho.

21. Proteína, de acordo com a reivindicação 20, em que a cromatografia por afinidade é cromatografia por afinidade de lectina.

22. Proteína, de acordo com a reivindicação 17, em que a proteína é um anticorpo monoclonal expresso em uma célula hospedeira geneticamente construída tendo níveis melhorados de anticorpos monoclonais assilados.

23. Composição farmacêutica compreendo uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 16-22, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

24. Método de usar a composição como definida na reivindicação 23, para tratamento ou diagnóstico de uma doença ou condição.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que a proteína é usada para tratar uma doença neoplástica selecionada a partir do grupo

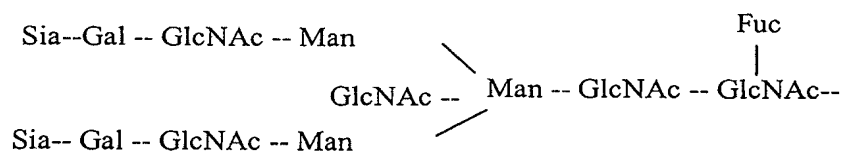
consistindo em um carcinoma, um linfoma, um sarcoma, e um mieloma.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que a proteína é usada para tratar um distúrbio inflamatório selecionado a partir do grupo consistindo em psoríase, artrite reumatoide, colite ulcerativa, doença de intestino inflamatória, Doença de Crohn, e lúpus eritematoso sistêmico.

27. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que a proteína é usada para tratar distúrbios envolvendo neovascularização da córnea ou retina.

28. Qualquer invenção descrita aqui.

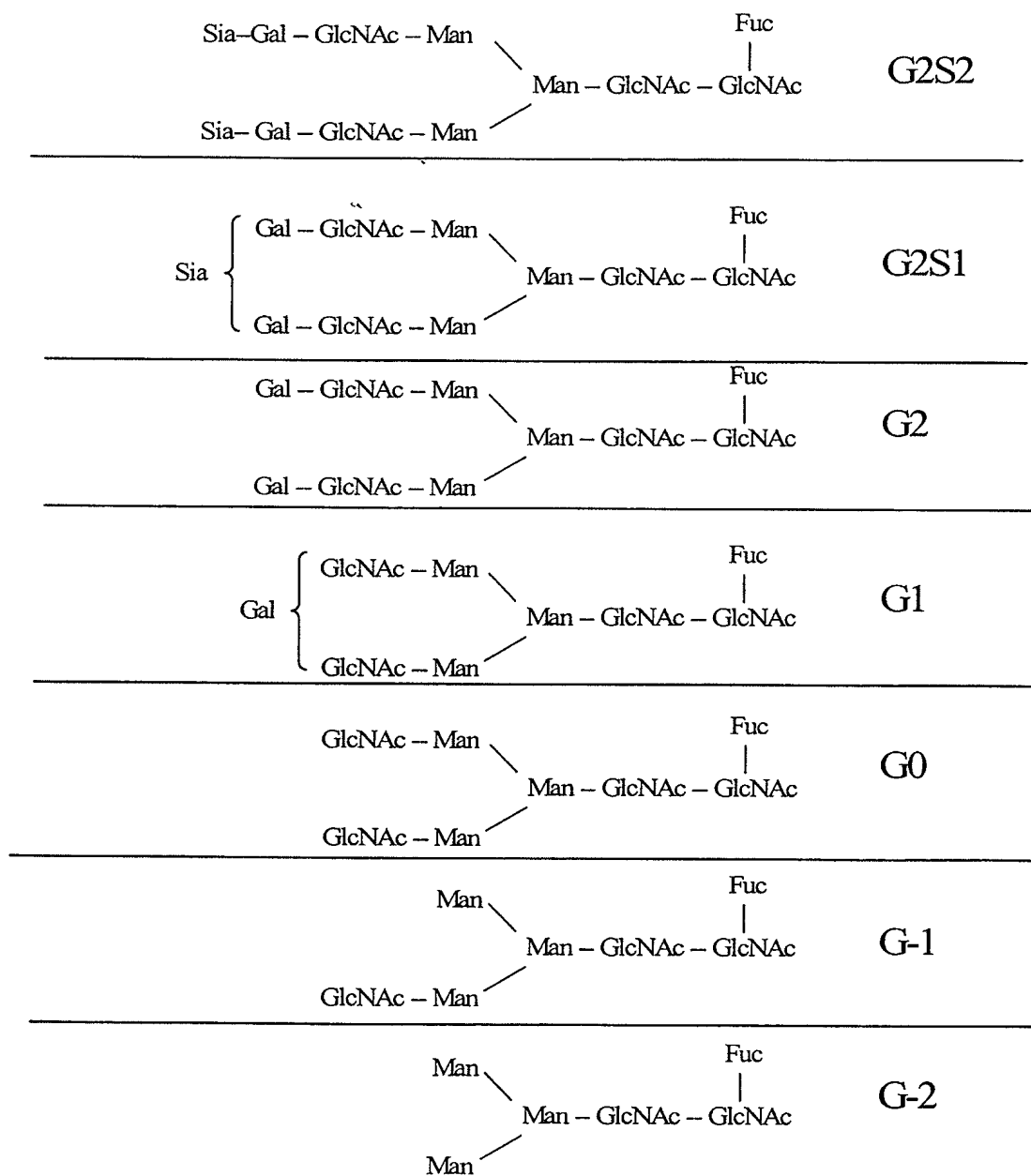
FIG. 1



Fuc = fucosila ; Gal = galactosila ; Glc = glucosila ; GlcNAc = N-acetilglucosaminila ; Man = manosila ; and Sia* = sialila (NANA, N-acetilneuraminila).

*Sia, ácido siálico, que é tipicamente NANA, ácido 5-N-acetilneuramínico, (NeuAc) ou NGNA, ácido 5-N-glicoli1neuramínico (NeuGc). Outro ácido siálico foi encontrado ou pode ser quimicamente sintetizado

FIG. 2



Mesma legenda da Fig. 1

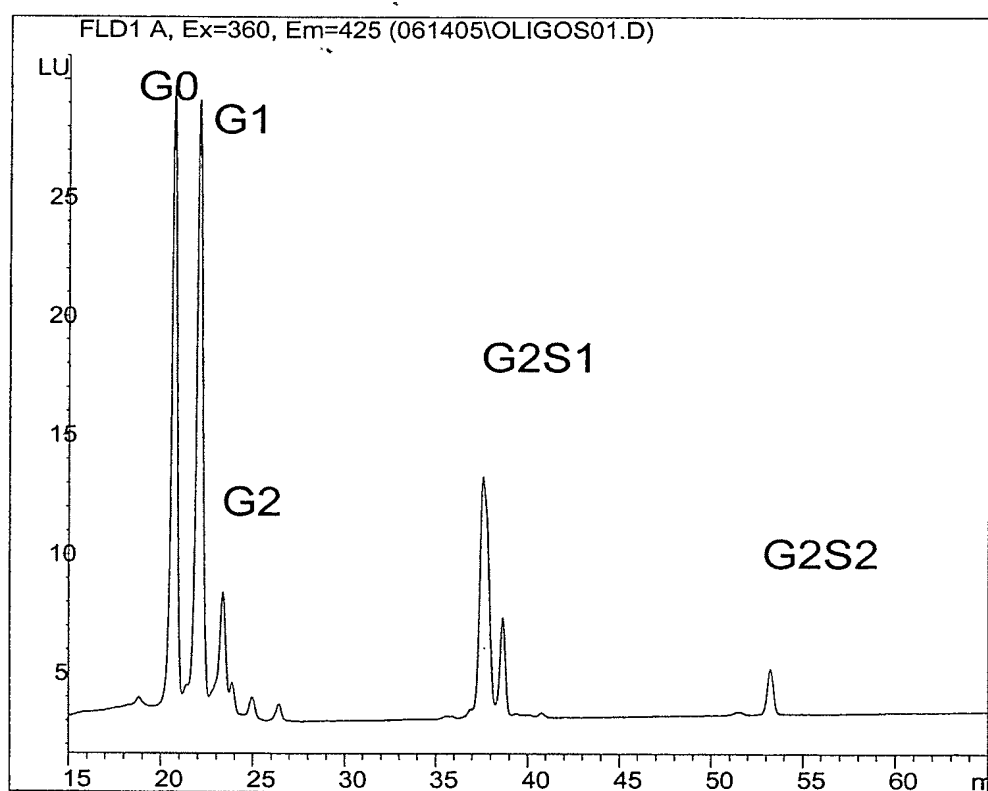
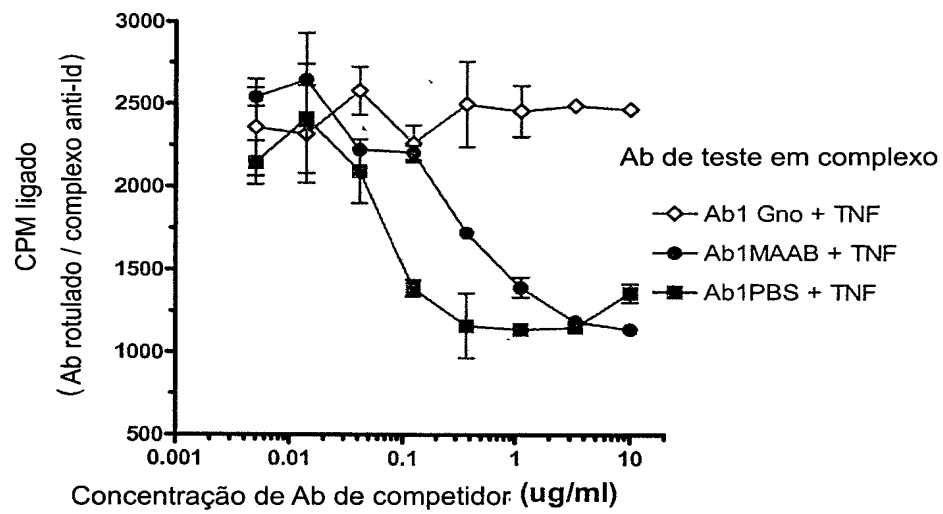


FIG. 3

FIG. 4

A)



B)

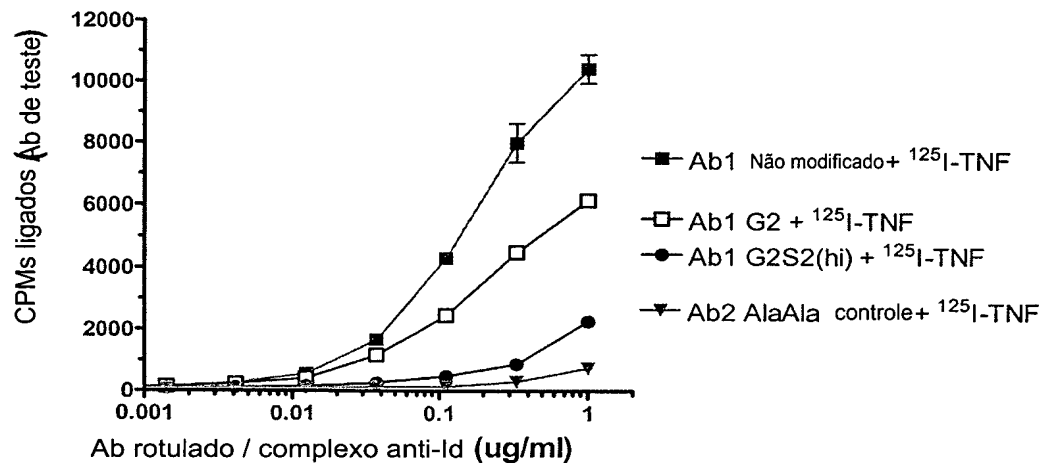


FIG. 5

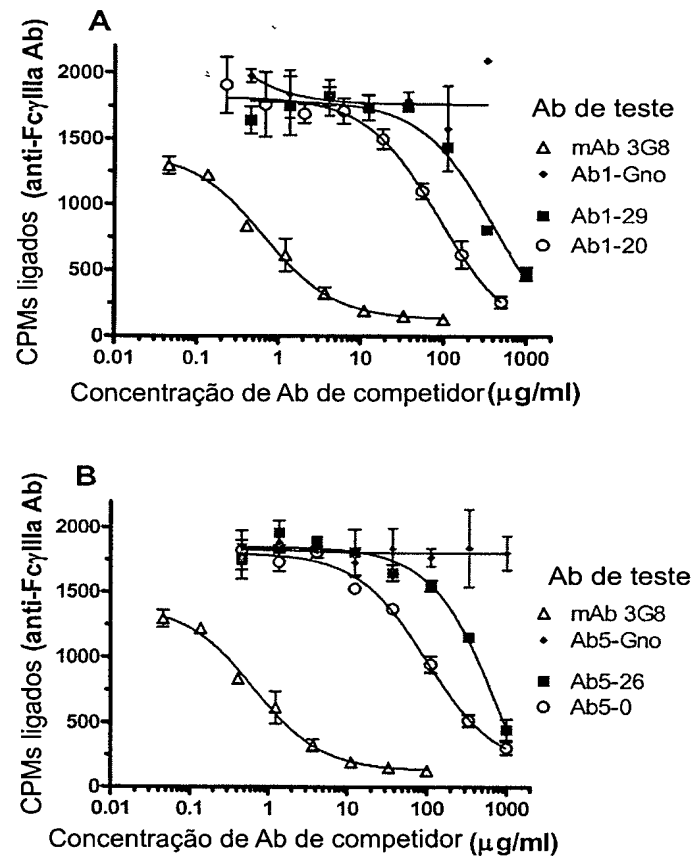


FIG. 5 (continuação)

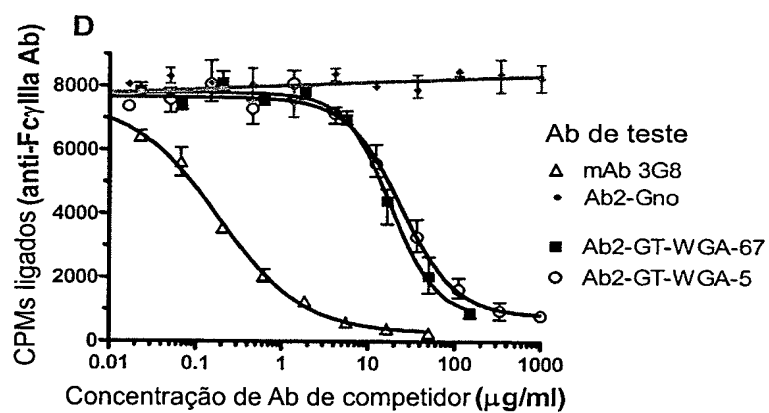
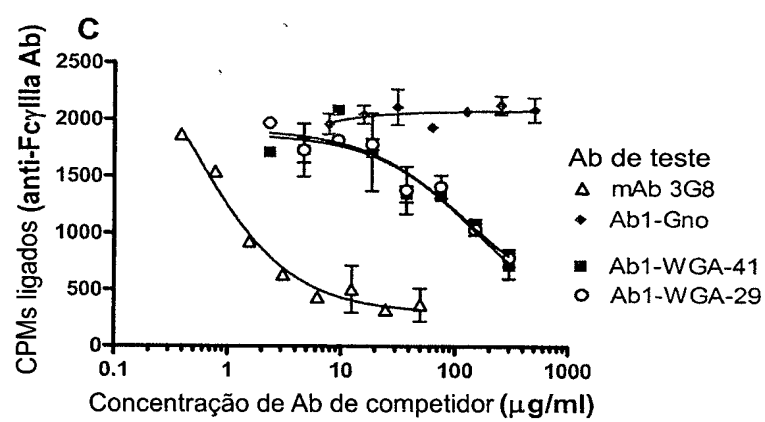


FIG. 6

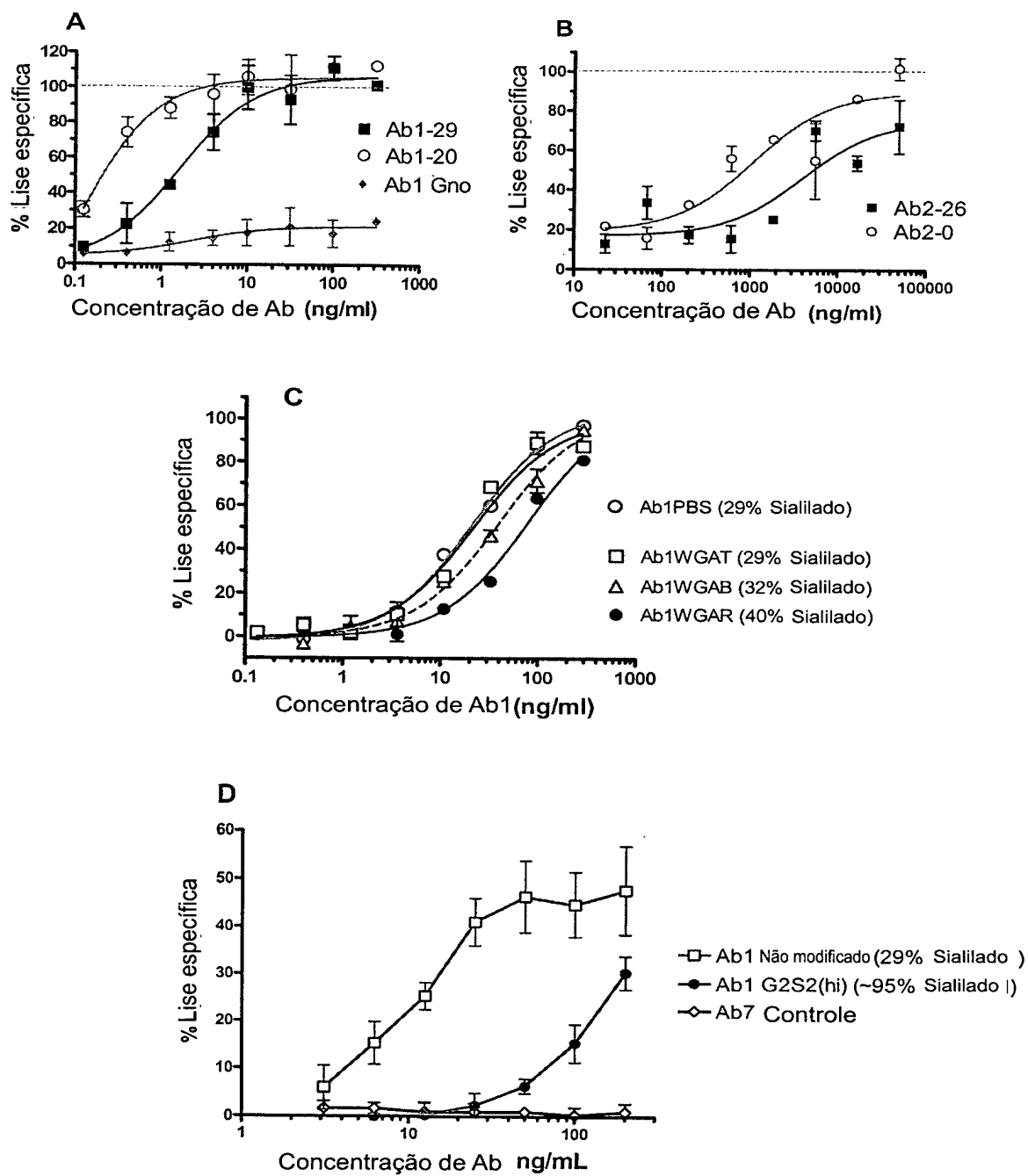
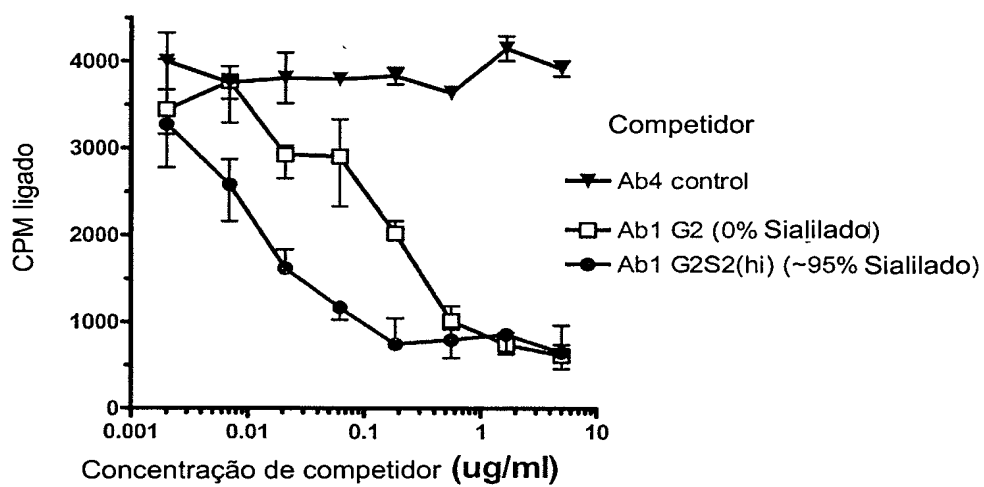


FIG. 7

A)



B)

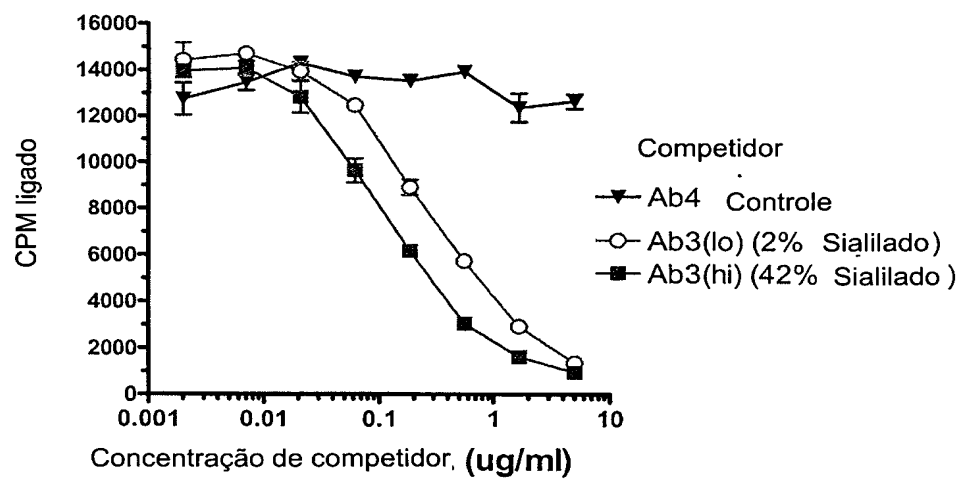


FIG. 8

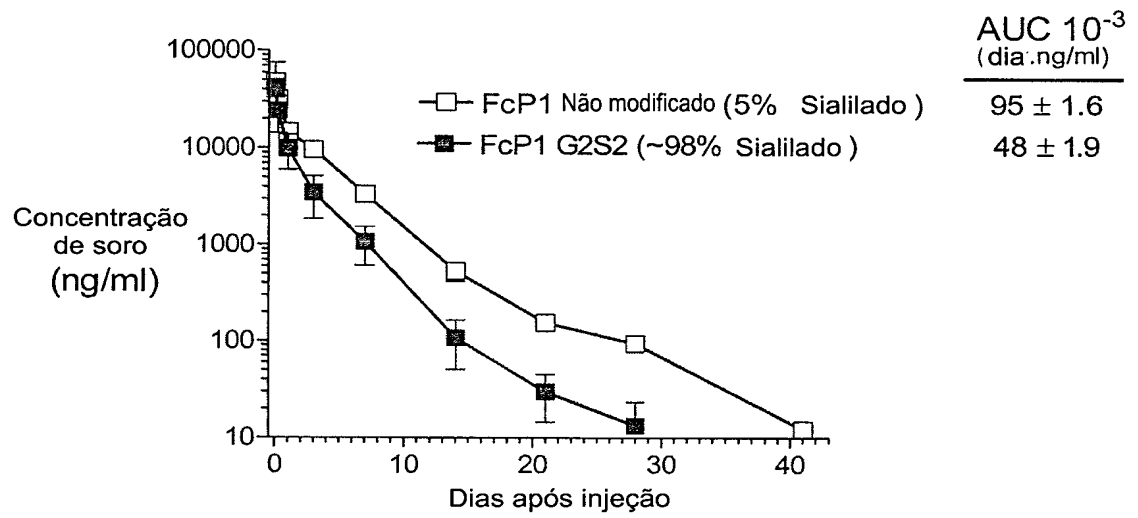


FIG. 9

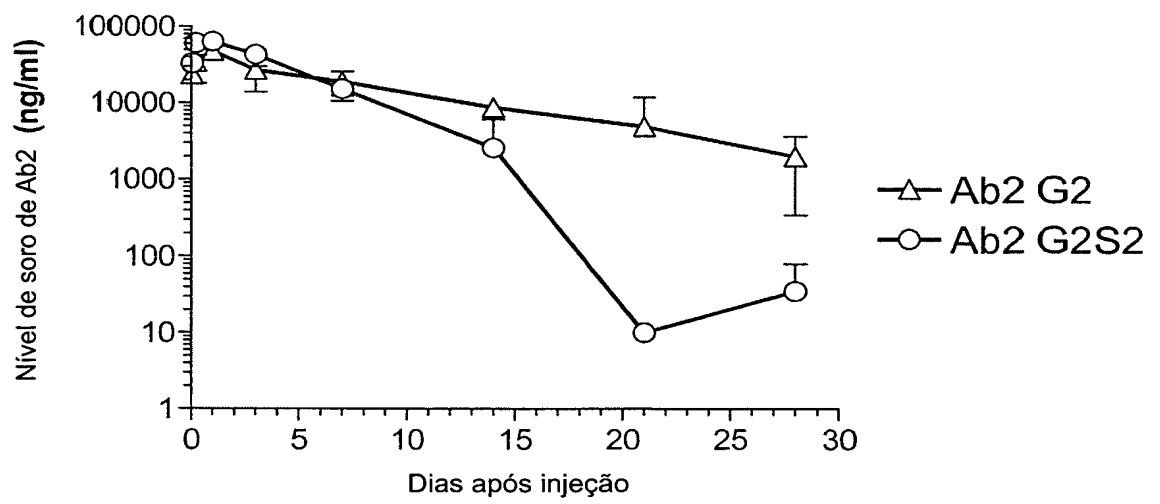


FIG. 10

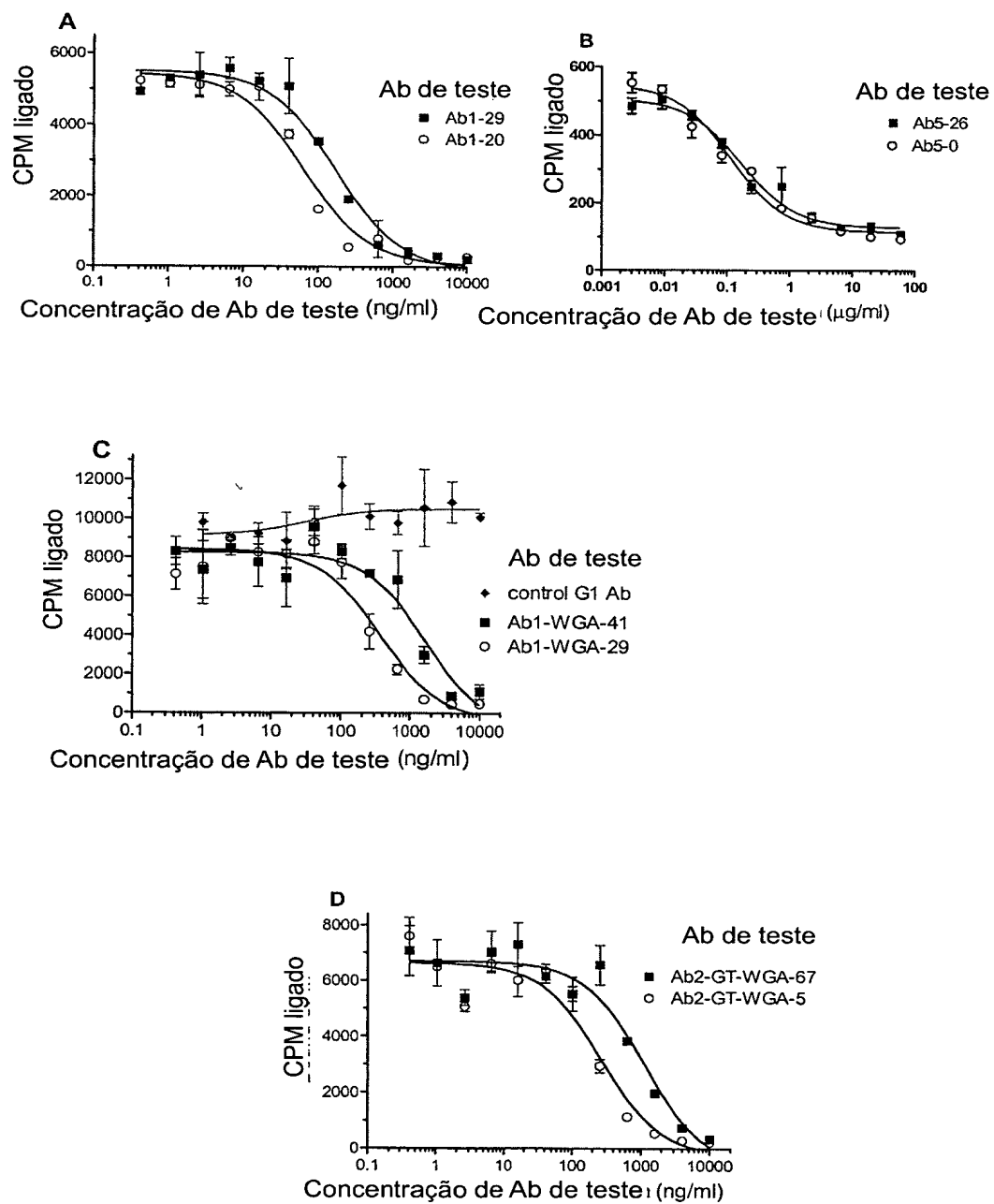


FIG. 11

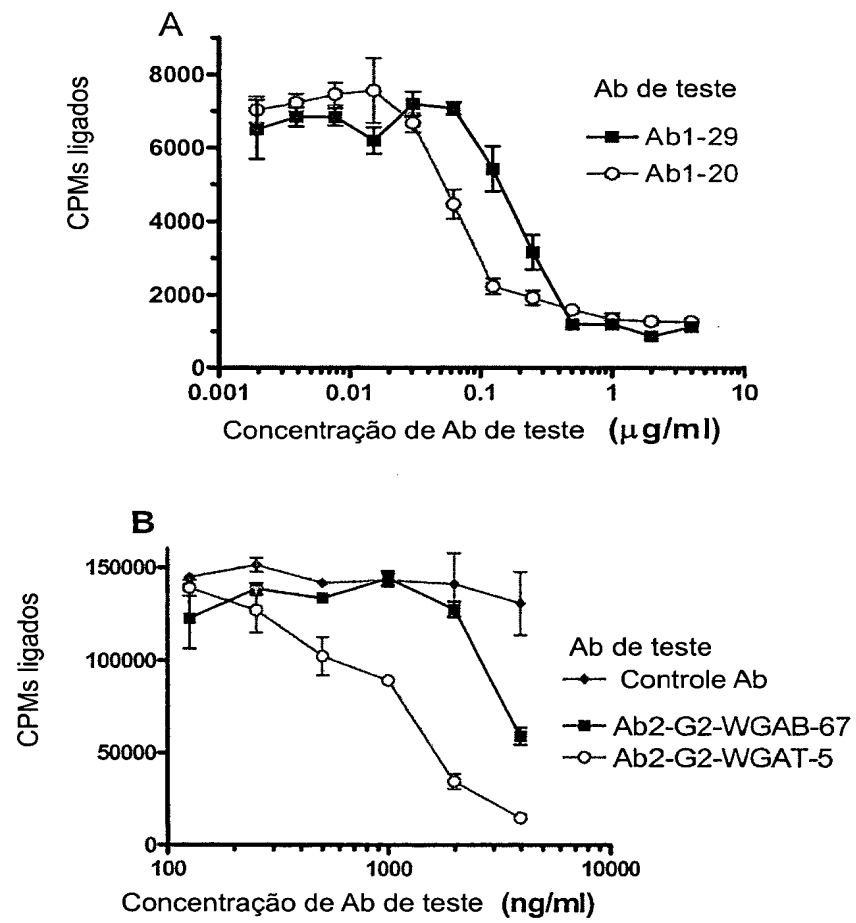


FIG. 12

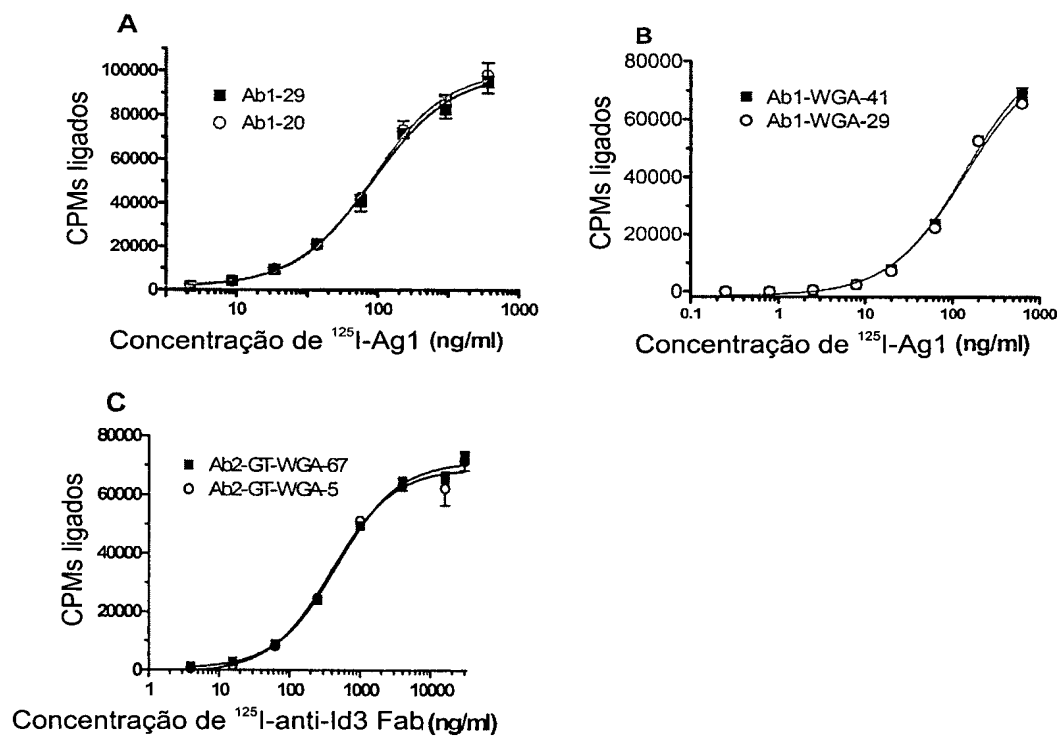


FIG. 13

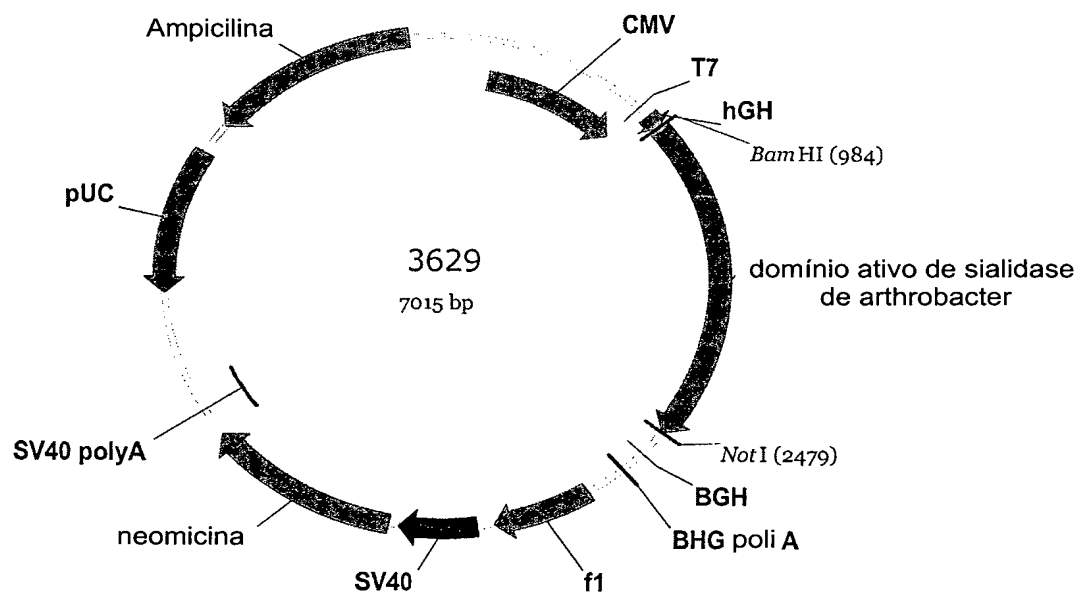
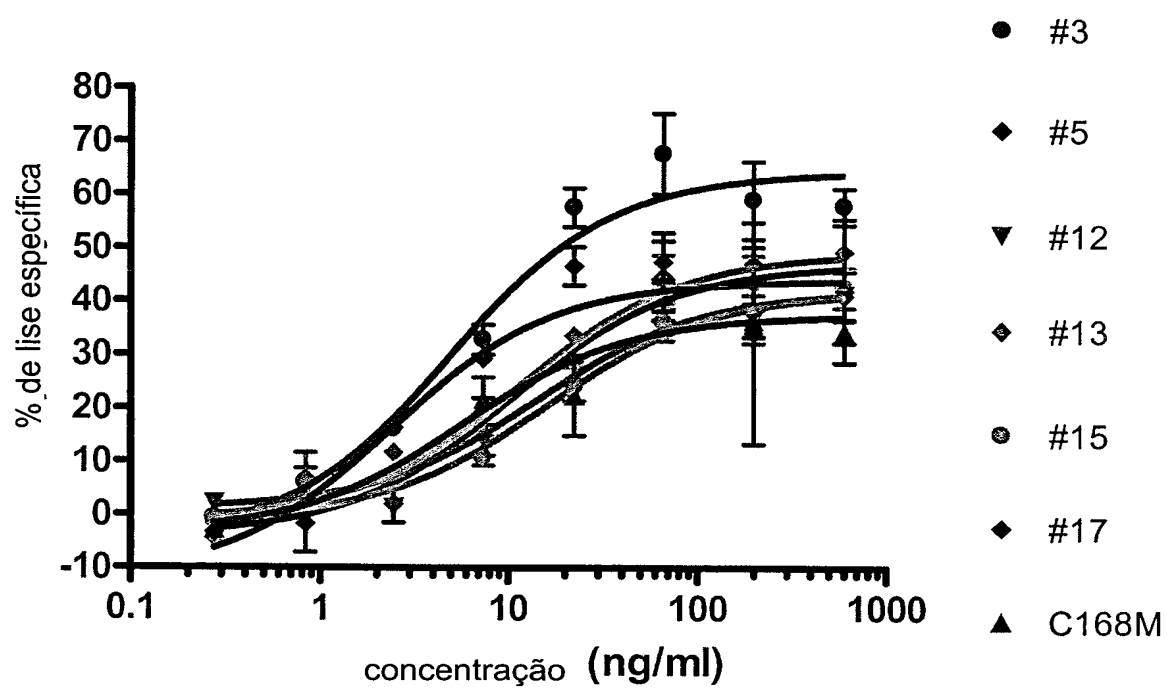


FIG. 14

Resumo de células K2 de doador 1



RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E VETORES PARA GERAR IMUNOGLOBULINAS ASIALILADAS"**.

5 As propriedades de uma proteína contendo Fc, por exemplo, um anticorpo, são controladas alterando a sialilação dos oligossacarídeos na região Fc transfetando a transfetando a linhagem de célula que expressa a proteína contendo Fc com uma sequência de vetor que codifica a sialidase. Proteína modificada contendo Fcs têm utilidade terapêutica em doenças ou condições nas quais é desejável controlar a afinidade de um ou mais de

10 Fc γ RI, Fc γ RIIA, e receptores Fc γ RIIIA, atividade ADCC, ativação de macrófago ou monócito, meia-vida de soro, e avidéz.