

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 434 961**

(51) Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.1999 E 09014605 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **30.08.2017 EP 2180007**

(54) Título: **Ingeniería de glicosilación de anticuerpos para mejorar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo**

(30) Prioridad:

20.04.1998 US 82581 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
18.01.2018

(73) Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren, CH**

(72) Inventor/es:

**UMAÑA, PABLO;
JEAN-MAIRET, JOËL y
BAILEY, JAMES E.**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Ingeniería de glicosilación de anticuerpos para mejorar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo

5 I. CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo de la ingeniería de glicosilación de proteínas. Más particularmente, la 10 presente invención se refiere a ingeniería de glicosilación para generar proteínas con propiedades terapéuticas mejoradas, que incluyen anticuerpos con citotoxicidad celular aumentada dependiente del anticuerpo.

10 II. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las glicoproteínas median muchas funciones esenciales en los seres humanos, otros organismos eucariotas, y 15 algunos procariotas, que incluyen catálisis, señalización, comunicación célula-célula, y reconocimiento y asociación moleculares. Las mismas constituyen la mayoría de las proteínas no citosólicas en los organismos eucariotas. Lis y Sharon, 1993, Eur. J. Biochem. 218:1-27. Muchas glicoproteínas han sido aprovechadas para propósitos terapéuticos, y durante las dos últimas décadas, las versiones recombinantes de glicoproteínas secretadas existentes naturalmente se han convertido en un producto importante de la industria biotecnológica. Ejemplos 20 incluyen eritropoyetina (EPO), anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs terapéuticos), activador del plasminógeno tisular (tPA), interferón-β, (IFN-β), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y gonadotropina coriónica humana (hCH). Cumming et al., 1991, Glycobiology 1:115-130.

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades concernientes a la eficacia de una 25 glicoproteína terapéutica, con inclusión de la estabilidad física, resistencia al ataque de las proteasas, interacciones con el sistema inmunitario, farmacocinética, y actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas, de los oligosacáridos. Pueden hacerse algunas generalizaciones entre la estructura de los oligosacáridos y la función de las glicoproteínas. Por ejemplo, 30 ciertas estructuras de oligosacárido median el aclaramiento rápido de la glicoproteína del torrente sanguíneo por interacciones con proteínas específicas de fijación de carbohidratos, en tanto que otras pueden estar ligadas por anticuerpos y desencadenar reacciones inmunes indeseables. Jenkins et al., 1996, Nature Biotechn. 14: 975-981.

Las células de mamífero son los hospedadores preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido 35 a su capacidad para glicosilar las proteínas en la forma más compatible para aplicación humana. Cumming, 1991, *arriba*; Jenkins et al., 1996, *arriba*. Las bacterias glicosilan proteínas muy raramente, y al igual que otros tipos de hospedadores comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y células vegetales, 40 producen patrones de glicosilación asociados con aclaramiento rápido del torrente sanguíneo, interacciones inmunes indeseables, y en algunos casos específicos, actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido utilizadas con gran frecuencia durante las dos últimas décadas. Además de proporcionar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten una generación coherente de líneas de 45 células clonales genéticamente estables y muy productivas. Las mismas pueden cultivarse hasta densidades altas en biorreactores simples utilizando medios exentos de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales utilizadas comúnmente incluyen células de riñón de cría de hámster (BHK), células de mieloma de ratón NSO- y SP-2/0. Más recientemente, se ha testado también la producción a partir de 50 animales transgénicos. Jenkins et al., 1996, *arriba*.

La glicosilación de proteínas terapéuticas recombinantes producidas en células animales puede realizarse 55 técnicamente por sobreexpresión de genes de glicosil-transferasa en células hospedadoras. Bailey, 1991, *Science* 252: 1668-1675. Sin embargo, el trabajo previo en este campo ha utilizado únicamente la expresión constitutiva de los genes de glicosil-transferasa modificadores de glicoproteínas, y se ha prestado escasa atención al nivel de expresión.

WO 97/30087 se refiere a una preparación de anticuerpos en la cual un sitio de glicosilación en N del dominio Fc del anticuerpo está sustituido con un oligosacárido bi-antenario, en donde al menos 20% de la preparación comprende moléculas de anticuerpo que tienen un oligosacárido que contiene al menos un residuo galactosa.

55 III. SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está dirigida a células hospedadoras para la generación de proteínas que tienen un patrón de 60 glicosilación alterado que da como resultado valores terapéuticos mejorados. En una realización específica, la invención está dirigida a células hospedadoras que han sido modificadas por ingeniería de tal modo que las mismas son capaces de expresar un rango preferido de una actividad de glicosil-transferasa modificadora de las

glicoproteínas que aumenta los oligosacáridos complejos enlazados a N que llevan GlcNAc bisectante. Se describen también en esta memoria métodos para la generación de glicoformas modificadas de glicoproteínas, por ejemplo anticuerpos, con inclusión de moléculas de anticuerpo enteras, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, teniendo una citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, y las glicoproteínas así generadas. La invención está basada, en parte, en el descubrimiento por los inventores de que existe un rango óptimo de expresión de glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas para la maximización de oligosacáridos complejos enlazados a N que llevan GlcNAc bisectante.

La presente invención proporciona una célula hospedadora de mamífero que expresa un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc de IgG que contiene oligosacáridos enlazados a N, en donde dicha célula hospedadora ha sido modificada genéticamente para regular la expresión incrementada de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, en donde dicho anticuerpo recombinante tiene una proporción incrementada de residuos GlcNAc en la región Fc con relación a la proporción de residuos fucosa y tiene una citotoxicidad celular incrementada mediada por Fc, comparado con el anticuerpo correspondiente producido por la misma célula hospedadora que no ha sido modificada genéticamente.

IV. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra la representación de estructuras típicas de oligosacáridos asociados a Fc.

La FIGURA 2 representa un análisis por transferencia western de la expresión regulada por tetraciclina de GnT-III en dos clones de CHO productores de tTA diferentes. Células CHOT2 (pistas A y B) CHOT17 (pistas C y D) se transfectaron con el vector de expresión pUDH10-3GnT-III^m y se cultivaron durante 36 horas en ausencia (pistas A y C) o presencia de tetraciclina, a una concentración de 400 ng/ml (pistas B y D). Se prepararon luego lisados de células para análisis por transferencia western sondando con un anticuerpo (9E10), que reconoce específicamente el marcador c-myc añadido a GnT-III en su término carboxi.

La FIGURA 3 representa la determinación del rango de concentraciones de tetraciclina en las que puede controlarse la expresión de GnT-III marcada con myc. Se transfectaron células CHOT17 con el vector de expresión pUDH10-3-GnT-III^m y se cultivaron luego durante 48 horas en presencia de las concentraciones indicadas de tetraciclina. Los niveles de GnT-III en los lisados se compararon en los lisados de células de estos cultivos utilizando análisis por transferencia western. Se detectó GnT-III por la vía del marcador c-myc utilizando el anticuerpo 9E10.

Las FIGURAS 4A a 4B representan el cribado de clones CHO para expresión estable y regulada por tetraciclina de GnT V (FIGURA 4A) o glicosiltransferasas GnT-III marcadas con myc (FIGURA 4B) por análisis por transferencia western. Se co-transfectaron células CHOT17 con un vector para expresión de resistencia a puromicina (pPUR) y o bien pUHD10-3GnTV (FIGURA 4A) o clones pUDH10-3GnT-III^m (FIGURA 4B) y se seleccionaron clones CHO estables respecto a resistencia a puromicina (7,5 μ ml), en presencia de tetraciclina (2 μ g/ml). Ocho clones (1-8) para cada glicosiltransferasa se cultivaron durante 48 horas en ausencia o presencia (+) de tetraciclina (2 μ g/ml) y se analizaron por transferencia western utilizando o bien un anticuerpo anti-GnT V (FIGURA 4A) o un anticuerpo anti-myc (9E-10) (FIGURA 4B).

Las FIGURAS 5A y 5B representan la verificación de la actividad de glicosiltransferasas heterólogas GnT V (FIGURA 5A) y GnT-III (FIGURA 5B) *in vivo* por análisis por transferencia de lectina. Glicoproteínas celulares procedentes de diversos clones estables (numerados como en la FIGURA 4), cultivadas en ausencia o presencia (+) de tetraciclina (2 μ g/ml), se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana, y se sondaron con lectinas L-PHA (FIGURA 5A) o E-PHA (FIGURA 5B). Estas lectinas se fijan con mayor afinidad a los productos oligosacáridos de reacciones catalizadas por GnT V y GnT-III, respectivamente, que a los sustratos oligosacáridos de estas reacciones. Se corrió en paralelo un marcador de peso molecular (MWM). Una comparación de las transferencias de lectina en las FIGURAS 5A y 5B indica un rango más amplio de sustratos, entre las proteínas celulares CHO endógenas, para GnT-III (FIGURA 5B) que para GnT V (FIGURA 5A).

Las FIGURAS 6A a 6D representan la inhibición del crecimiento celular después de la sobreexpresión de glicosiltransferasa. Células CHO-tet-GnT-III^m se sembraron hasta 5-10% de confluencia y se cultivaron en ausencia (FIGURAS 6A y 6B) o presencia (FIGURAS 6C y 6D) de tetraciclina. Los cultivos se fotografiaron 45 (FIGURAS 6A y 6C) y 85 (FIGURAS 6B y 6D) horas después de la siembra.

La FIGURA 7 representa secuencias de cebadores oligonucleotídicos utilizados en PCRs para la construcción del gen de la cadena pesada de chCE7. Los cebadores directos e inversos se identifican por los sufijos ".fwd" y ".rev", respectivamente. Se indican los solapamientos entre cebadores diferentes, necesarios para realizar los pasos secundarios de la PCR utilizando como plantilla el producto de un paso PCR primario. Se indican también sitios de

restricción introducidos, secuencias de reasociación al DNA genómico químérico de CE7, y la secuencia conductora sintética introducida.

La FIGURA 8 representa secuencias de cebadores oligonucleotídicos utilizados en PCRs para la construcción del gen de la cadena ligera de chCE7. Los cebadores directos e inversos se identifican por los sufijos ".fwd" y ".rev", respectivamente. Se indican los solapamientos entre cebadores diferentes, necesarios para realizar los pasos secundarios de la PCR utilizando como plantilla el producto de un paso PCR primario. Se indican también sitios de restricción introducidos, secuencias de reasociación al DNA genómico químérico de CE7, y la secuencia conductora introducida.

La FIGURA 9 representa espectros MALDI/TOF/MS de mixturas de oligosacáridos neutros de muestras de chCE7 producidas por células de mieloma de ratón SP2/0 (FIGURA 9A, oligosacáridos de 50 µg de CE7-SP2/0) o por cultivos de células CHO-tetGnTIII-chCE7 que difieren en la concentración de tetraciclina añadida a los medios, y que expresan por tanto el gen GnT-III a diferentes niveles. En orden decreciente de concentración de tetraciclina, es decir, niveles crecientes de expresión del gen GnT-III, las últimas muestras son: CE7-2000t (FIGURA 9B, oligosacáridos de 37,5 µg de anticuerpo), CE7-60t (FIGURA 9C, oligosacáridos de 37,5 µg de anticuerpo, CE7-30t (FIGURA 9D, oligosacáridos de 25 µg de anticuerpo) y CE7-15t (FIGURA 9E, oligosacáridos de 10 µg de anticuerpo).

La FIGURA 10 representa caminos de biosíntesis de oligosacáridos enlazados a N que conducen a oligosacáridos complejos biseccionados por la vía de una reacción catalizada por GnT-III. M significa manosa; Gn, N-acetilglucosamina (GlcNAc); G, galactosa; Gn^b, GlcNAc bisectante; f, fucosa. La nomenclatura de los oligosacáridos consiste en enumerar los residuos M, Gn y G unidos al oligosacárido central e indicar la presencia de una GlcNAc bisectante por inclusión de un Gn^b. El oligosacárido central se compone a su vez de dos residuos Gn y puede incluir o no una fucosa. Las clases principales de oligosacáridos se representan dentro de marcos punteados. Man I significa la manosidasa de Golgi; GnT, GlcNAc-transferasa; y GalT, galactosiltransferasa. La masa asociada con el ion principal de oligosacárido asociado a sodio que se observa en el análisis MALDI-TOF/MS se representa junto a cada oligosacárido. Para los oligosacáridos que pueden estar potencialmente fucosilados en el centro, se representan las masas asociadas tanto con las formas fucosiladas (+f) como con las no fucosiladas (-f).

La FIGURA 11 representa el camino de biosíntesis de oligosacáridos enlazados a N que conduce a oligosacáridos complejos biseccionados e híbridos biseccionados por reacciones catalizadas por GnT-III. M significa manosa; Gn, N-acetilglucosamina (GlcNAc); G, galactosa; Gn^b, GlcNAc bisectante; F, fucosa. La nomenclatura de los oligosacáridos consiste en la enumeración de los residuos M, Gn y G unidos al oligosacárido común y la indicación de la presencia de GlcNAc bisectante por inclusión de un Gn^b. El oligosacárido central se compone a su vez de dos residuos Gn y puede incluir o no una fucosa. Las clases principales de oligosacáridos se representan dentro de marcos punteados. Man I significa la manosidasa de Golgi; TnT, GlcNAc-transferasa; y GaIT, galactosiltransferasa. La masa asociada con el ion principal de oligosacárido asociado a sodio que se observa en el análisis MALDI-TOF/MS se representa junto a cada oligosacárido. Para los oligosacáridos que pueden estar potencialmente fucosilados en el centro, se representan las masas asociadas tanto con las formas fucosiladas (+f) como con las no fucosiladas (-f).

La FIGURA 12 representa la actividad de ADCC de muestras de chCE7 diferentes. La lisis de las células de neuroblastoma IMR-32 por linfocitos humanos (ratio diana:efector de 1:19, incubación durante 16 h a 36°C), mediada por concentraciones diferentes de muestras de chCE7 se midió por retención de un tinte fluorescente. El porcentaje de citotoxicidad se calcula con relación a un control de lisis total (por medio de un detergente), después de sustracción de la señal en ausencia de anticuerpo.

La FIGURA 13 representa la expresión de GnT-III de diferentes cultivos de CHO-tet-GnTIII que se han dejado crecer a concentraciones diferentes de tetraciclina utilizadas para producir muestras de anticuerpos C2B8 distintos. Los lisados de células de cada cultivo dejado crecer a concentraciones de tetraciclina de 2000 ng/ml (Pista C) y 25 ng/ml (Pista D) se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana, y se sondaron con 9E 10 (Véase arriba) y peroxidasa de rábano picante anti-ratón como anticuerpos primario y secundario, respectivamente. La Pista A representa un control negativo.

Las FIGURAS 14A y 14B representan la especificidad de fijación de antígeno del anticuerpo monoclonal C2B8 anti-CD20 utilizando un ensayo indirecto de inmunofluorescencia con células en suspensión. Se utilizaron células positivas CD20 (células SB; depósito ATCC No. ATCC CCL120) y células CD20 negativas (células HSB; depósito ATCC No. ATCC CCL120.1), FIGURA 14A y 14B respectivamente. Las células de cada tipo se incubaron con anticuerpo C2B8 producido a 25 ng/ml de tetraciclina como anticuerpo primario. Los controles negativos incluían HB-

SSB en lugar de anticuerpo primario. Se utilizó un anticuerpo polyclonal anti-IgG humana específico de Fc, conjugado a FITC, para todas las muestras como anticuerpo secundario.

5 La FIGURA 15 representa la actividad de ADCC de diferentes muestras de anticuerpo C2B8 a concentraciones de anticuerpo diferentes (0,04-5 µg/ml). La muestra C2B8-nt representa la actividad de ADCC del anticuerpo C2B8 producido en una línea de células sin expresión de GnT-III. Las muestras C2B8-2000t, C2B8-50t y C2B8-25t representan la actividad de ADCC de tres muestras de anticuerpo producidas a concentraciones decrecientes de tetraciclina (es decir, con expresión creciente de GnT-III).

10 V. DEFINICIONES

Los términos se utilizan en esta memoria como se emplean generalmente en la técnica, a no ser que se defina otra cosa en los párrafos siguientes:

15 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término anticuerpo incluye moléculas de anticuerpo enteras, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

20 Como se utiliza en esta memoria, el término glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas hace referencia a una enzima que realiza la modificación del patrón de glicosilación de una glicoproteína. Ejemplos de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas incluyen, pero sin carácter limitante, glicosil-transferasas tales como GnT-III, GnT V, GaIT, y Man II.

25 Como se utiliza en esta memoria, se considera que el término ingeniería de glicosilación incluye cualquier clase de cambio en el patrón de glicosilación de un polipéptido existente naturalmente o fragmento del mismo. La ingeniería de glicosilación incluye ingeniería metabólica de la maquinaria de glicosilación de una célula, con inclusión de manipulaciones genéticas de los caminos de síntesis de oligosacáridos para conseguir una glicosilación alterada de las glicoproteínas expresadas en las células. Adicionalmente, la ingeniería de glicosilación incluye los efectos de mutaciones y del ambiente celular durante la glicosilación.

30 Como se utiliza en esta memoria, el término célula hospedadora abarca cualquier clase de sistema celular que pueda ser modificado por ingeniería para generar glicoformas modificadas de proteínas, fragmentos de proteínas, o péptidos de interés, con inclusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Típicamente, las células hospedadoras se han manipulado para expresar niveles optimizados de al menos una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas, incluyendo, pero sin carácter limitante, GnT-III, GnT V, GaIT, y Man II, y/o al menos una glicosidasa. Células hospedadoras incluyen células cultivadas, v.g. células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, o células de hibridoma, células de levadura, y células de insecto, para citar solamente unas cuantas, pero también células comprendidas en un animal transgénico o tejido cultivado.

40 Como se utiliza en esta memoria, el término citotoxicidad celular mediada por Fc tiene por objeto incluir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y citotoxicidad celular dirigida a aquellas células que se han modificado por ingeniería para expresar en su superficie celular una región Fc o región equivalente de una inmunoglobulina G, y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión soluble consistente en un dominio proteínico diana fusionado al término N de una región Fc o región equivalente de una inmunoglobulina G.

45 VI. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. Resumen General

50 El objetivo de la presente invención es proporcionar glicoformas de proteínas, en particular anticuerpos, que incluyen moléculas de anticuerpos enteras, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, para producir nuevas variantes de una proteína terapéutica. La invención está basada, en parte, en el descubrimiento por los inventores de que la red de reacciones de glicosilación de una célula puede manipularse para maximizar la proporción de ciertas glicoformas en la población, y que ciertas glicoformas tienen características terapéuticas mejoradas. La invención está basada adicionalmente, en parte, en el descubrimiento de vías para identificar glicoformas de proteínas que tienen un valor terapéutico mejorado, y el modo de generarlas de manera reproducible. La invención está basada adicionalmente, en parte, en el descubrimiento de que existe un rango preferido de expresión de glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas en la célula generadora de anticuerpos, para aumentar los oligosacáridos complejos enlazados a N que son portadores de GlcNAc bisectante.

Se describen en esta memoria métodos para la ingeniería de glicosilación de proteínas a fin de alterar y mejorar sus propiedades terapéuticas. De modo más específico, la presente invención describe métodos para producir en una célula hospedadora un anticuerpo que tiene un patrón de glicosilación alterado que da como resultado una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada ADCC. Para la práctica de los métodos, la presente

5 invención proporciona células hospedadoras que albergan un ácido nucleico que codifica un anticuerpo y al menos un ácido nucleico que codifica una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas. Se describen en esta memoria métodos y protocolos para cultivar dichas células hospedadoras en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo deseado que tiene un patrón de glicosilación alterado que da como resultado una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada. Adicionalmente, se describen métodos para aislamiento del anticuerpo 10 así generado con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada.

En realizaciones más específicas de la invención, dos anticuerpos monoclonales, a saber el anticuerpo anti-neuroblastoma chCE7, y el anticuerpo C2B8 anti-CD20, se han utilizado como glicoproteínas terapéuticas modelo, y las glicoformas diana han sido aquéllas que llevan una clase especial de carbohidrato, a saber los oligosacáridos complejos bi-antenarios enlazados a N modificados con N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante. En el sistema modelo propuesto por la invención, se utilizan células CHO como células hospedadoras, aunque pueden contemplarse muchos otros sistemas de células como sistema de células hospedadoras. La glicosil-transferasa que añade una GlcNAc bisectante a diversos tipos de oligosacáridos enlazados a N, GlcNAc-transferasa III (GnT-III), no es producida normalmente por las células CHO. Stanley y Campell, 1984, J. Biol. Chem. 1:13370-13378.

20 A fin de investigar experimentalmente los efectos de la sobreexpresión de GnT-III, se estableció una línea de células HCO con sobreexpresión regulada por tetraciclina de un cDNA de GnT-III de rata. Utilizando este sistema experimental, los inventores descubrieron que la sobreexpresión de GnT-III a niveles altos conducía a la inhibición del crecimiento y era tóxica para las células. Otra línea de células CHO con sobreexpresión regulada por tetraciclina 25 de GnT V, que es una glicosil-transferasa distinta, exhibía el mismo efecto inhibidor, lo que indicaba que ésta puede ser una característica general de la sobreexpresión de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas. El efecto de la expresión enzimática del crecimiento celular establece un límite superior para el nivel de sobreexpresión de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas y puede por tanto limitar también el grado en el que pueden 30 modificarse los sitios de glicosilación difícilmente accesibles por ingeniería de los caminos y patrones de glicosilación que utilizan vectores de expresión no regulados.

35 Se da a conocer la producción de una serie de muestras de chCE7mAb y C2B8 que difieren en sus distribuciones de glicoformas por control de la expresión de GnT-III en un rango entre los niveles basales y tóxicos. La medida de la actividad de ADCC de las muestras de mAb de chCE7 exhibía un rango óptimo de expresión de GnT-III para actividad biológica de chCE7 máxima *in vitro*. La actividad estaba correlacionada con el nivel de oligosacáridos complejos biseccionados asociados a Fc. La expresión de GNT-III dentro del rango práctico, *i.e.* donde no se observan inhibición significativa del crecimiento y toxicidad, condujo a un aumento en las estructuras complejas diana biseccionadas para este conjunto de muestras de chCE7. El patrón de los picos de oligosacáridos en el análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF de las muestras de chCE7 producidas a niveles altos de GnT-III 40 indica que una proporción importante de sustratos potenciales de GnT-III se desvía a sub-productos oligosacáridos híbridos biseccionados. Por consiguiente, la minimización de estos sub-productos por ingeniería ulterior del camino podría ser valiosa.

45 B. Identificación y Generación de Ácidos Nucleicos que Codifican una Proteína para la Cual se Desea la Modificación del Patrón de Glicosilación

La presente invención proporciona sistemas de células hospedadoras adecuados para la generación de glicoformas alteradas de cualquier proteína, fragmento de proteína o péptido de interés, para el cual se desea una alteración de este tipo en el patrón de glicosilación. Los ácidos nucleicos que codifican dicha proteína, fragmento de proteína o péptido de interés pueden obtenerse por métodos conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede aislarse de una biblioteca de cDNA o biblioteca genómica. Para una realización de las estrategias de clonación que pueden utilizarse, véase, v.g., Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.: y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

55 En una realización alternativa de la invención, la secuencia codificante de la proteína, fragmento de proteína o péptido de interés puede sintetizarse en todo o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Caruthers et al., 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-233; Crea y Horn, 1980, Nuc. Acids Res. USA 9:2331; Matteucci y Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21:719; Chow y Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 60 9:2807-2817. Alternativamente, la proteína propiamente dicha podría producirse utilizando métodos químicos para

sintetizar su secuencia de aminoácidos totalmente o en parte. Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos por técnicas de fase sólida, escindirse de la resina, y purificarse por cromatografía líquida preparativa de alta resolución. V.g. Véase Creighton, 1983, Protein Structures And Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y. pp. 50-60. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (v.g., el procedimiento de degradación de Edman; Véase Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y., pp. 34-49).

Se describen en esta memoria métodos para la generación y uso de sistemas de células hospedadoras para la producción de glicoformas de anticuerpos o anticuerpo. Se describen en esta memoria fragmentos o proteínas de fusión que incluyen fragmentos de anticuerpo con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos aumentada. La identificación de epítopes diana y generación de anticuerpos que tienen valor terapéutico potencial, para los cuales se desea la modificación del patrón de glicosilación, y el aislamiento de su secuencia de ácidos nucleicos codificantes respectiva está dentro del alcance de la invención.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos para epítopes diana de interés. Tales anticuerpos incluyen, pero sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, monoclonales, químéricos, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Tales anticuerpos pueden ser útiles, v.g., como agentes diagnósticos o terapéuticos. Como agentes terapéuticos, son de interés especialmente preferido anticuerpos neutralizantes, es decir, aquéllos que compiten por la fijación con un ligando, sustrato o molécula adaptadora.

Para la producción de anticuerpos, diversos animales hospedadores no humanos se inmunizan por inyección con la proteína diana de interés con inclusión, pero sin carácter limitante, de conejos, ratones, ratas, etc. Para aumentar la respuesta inmunológica pueden utilizarse diversos adyuvantes, dependiendo de la especie hospedadora, con inclusión, pero sin carácter limitante, de adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como isolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Anticuerpos monoclonales para la diana de interés se pueden preparar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas de células continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495-497, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Adicionalmente, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos químicos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) por remodelación de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes procedentes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente U.S. No. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios que tienen una especificidad deseada.

Fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de fijación específicos de la proteína diana de interés pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin carácter limitante, fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de los fragmentos monoclonales Fab con la especificidad deseada para la proteína diana de interés.

Una vez que se ha identificado un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para el cual se desea modificación en el patrón de glicosilación, la secuencia de ácido nucleico codificante se identifica y se aísla utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Véase arriba.

C. Generación de Líneas de Células para la Producción de Proteínas Con Patrón de Glicosilación Alterado

La presente invención proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras para la generación de proteínas que tienen patrones de glicosilación modificados. En particular, la presente invención proporciona sistemas de células hospedadoras para la generación de glicoformas de proteínas que tienen un valor terapéutico aumentado.

Para ello, la invención proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras seleccionados o modificados por ingeniería para aumentar la expresión de una glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas. Específicamente, tales sistemas de expresión de células hospedadoras pueden modificarse por ingeniería para comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas,

5 enlazada operativamente a un sistema promotor constitutivo o regulado. Alternativamente, pueden emplearse sistemas de expresión de células hospedadoras que producen naturalmente, son inducidos para producir, y/o se seleccionan para producir una glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas.

10 En una realización específica, la presente invención proporciona una célula hospedadora que se ha modificado por ingeniería para expresar al menos un ácido nucleico codificante de una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas. En un aspecto, la célula hospedadora se transforma o se transfecta con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas. En un aspecto alternativo, la célula hospedadora se ha modificado por ingeniería y/o seleccionado de tal manera que se activa una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas endógena. Por ejemplo, la célula hospedadora puede

15 seleccionarse para transportar una mutación que desencadena la expresión de una glicosil-transferasa endógena modificadora de glicoproteínas. Este aspecto se ilustra en una realización específica, en la cual la célula hospedadora es un mutante CHO lec 10. Alternativamente, la célula hospedadora puede modificarse por ingeniería de tal modo que se activa una glicosil-transferasa endógena modificadora de glicoproteínas. En otra alternativa adicional, la célula hospedadora se modifica por ingeniería de tal manera que una glicosil-transferasa modificadora

20 de glicoproteínas endógenas ha sido activada por inserción de un elemento promotor regulado en el cromosoma de la célula hospedadora. En una alternativa adicional, la célula hospedadora se ha modificado por ingeniería de tal manera que se ha activado una glicosil-transferasa endógena modificadora de glicoproteínas por inserción de un elemento promotor constitutivo, un transposón, o un elemento retroviral en el cromosoma de la célula hospedadora.

25 Generalmente, cualquier tipo de línea de células cultivado puede utilizarse como sustrato para modificar por ingeniería la línea de células hospedadoras de la presente invención. En una realización preferida, se utilizan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, o una línea de células de hibridoma como la línea de células sustrato para generar las células hospedadoras modificadas por ingeniería de la invención.

30 Se exponen en esta memoria células hospedadoras modificadas por ingeniería que expresan cualquier tipo de glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas como se define en esta memoria. La glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas expresada por las células hospedadoras de la invención es GnT-III. No obstante, se divultan en esta memoria asimismo otros tipos de glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas, con inclusión de β (1,4)-galactosil-transferasa (GalT) y manosidasa II (Man II). En una realización de la invención, GnT-III se coexpresa con GalT. En otra realización de la invención, GnT-III se coexpresa con Man II.

35 Uno o varios ácidos nucleicos codificantes de una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado.

40 Sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión con conmutador lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión de metalotioneína inducible por metal. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas están comprendidos dentro del sistema de la célula hospedadora, algunos de ellos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles óptimos de expresión serán diferentes para cada proteína de interés, y se determinarán utilizando experimentación de rutina. Los niveles de expresión se determinan por métodos conocidos generalmente en la técnica, que incluyen análisis por transferencia western utilizando un anticuerpo específico de glicosil-transferasa, análisis por transferencia northern utilizando una sonda de ácido nucleico específico de glicosil-transferasa, o medida de la actividad enzimática. Alternativamente, puede emplearse una lectina que se fija a los productos biosintéticos de la glicosil-transferasa, por ejemplo, la lectina E₄-PHA. En una alternativa adicional, el ácido nucleico puede estar enlazado operativamente a un gen informador; los niveles de expresión de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas se determinan por medida de una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen informador. El gen informador puede transcribirse junto con el o los ácidos nucleicos codificantes de dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas como una sola molécula de mRNA; sus secuencias codificantes respectivas pueden estar enlazadas sea por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o por un mejorador de la traducción independiente de la cápsula (CITE). El gen informador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico codificante de dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas de tal modo que se forme una sola cadena polipeptídica. El ácido nucleico codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas puede estar enlazado operativamente al gen informador bajo el control de un solo promotor, de tal modo que el ácido nucleico codificante de la glicosil-transferasa modificadora de

las glicoproteínas y el gen informador se transcriben en una molécula de RNA que sufre alternativamente remodelación en dos moléculas de RNA mensajero (mRNA) separadas; uno de los mRNAs resultantes se traduce en dicha proteína informadora, y el otro se traduce en dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas.

- 5 Si se expresan varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas, los mismos pueden disponerse de tal manera que se transcriban como una sola o como varias moléculas de mRNA. Si los mismos se transcriben como una sola molécula de mRNA, sus secuencias codificantes respectivas pueden estar enlazadas sea por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o por un intensificador de la traducción independiente de la cápsula (CITE). Aquéllos pueden transcribirse a partir de un solo promotor en una molécula de RNA que sufre remodelación alternativamente en varias moléculas de RNA mensajero (mRNA) separadas, cada una de las cuales se traduce luego en su respectiva glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas codificada.
- 10 Se describen también en esta memoria sistemas de expresión de la célula hospedadora para la generación de proteínas terapéuticas, por ejemplo anticuerpos, que tienen una citotoxicidad celular aumentada dependiente de anticuerpos, y células que presentan la región Fc de IgG en la superficie para promover la citotoxicidad mediada por Fc. Generalmente, los sistemas de expresión de células hospedadoras se han modificado por ingeniería y/o seleccionado para expresar ácidos nucleicos que codifican la proteína para la cual se desea la producción de glicoformas alteradas, junto con al menos un ácido nucleico que codifica una glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas. El sistema de la célula hospedadora se transfecta con al menos un gen que codifica una glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas. Típicamente, las células transfectadas se seleccionan para identificar y aislar clones que expresan de manera estable la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas. La célula hospedadora se ha seleccionado para expresión de glicosil-transferasa endógena. Por ejemplo, pueden seleccionarse células que llevan mutaciones que desencadenan la expresión de glicosil-transferasas modificadoras de las glicoproteínas silenciosas en otro caso. Por ejemplo, se sabe que las células CHO transportan un gen GnT-III silencioso que es activo en ciertos mutantes, v.g., en el mutante Lec10. Adicionalmente, pueden utilizarse métodos conocidos en la técnica para activar genes de glicosil-transferasa silenciosos modificadores de las glicoproteínas, que incluyen la inserción de un promotor regulado o constitutivo, el uso de transposones, elementos retrovirales, etc.
- 15 20 25 30 Asimismo, puede hacerse uso de tecnologías de desactivación de genes o uso de métodos de ribozima para adaptar los niveles de expresión de glicosil-transferasas y/o glicosidasas de la célula hospedadora, y por consiguiente está dentro del alcance de la invención.
- 35 Cualquier tipo de línea de células cultivada puede utilizarse como sustrato para modificar por ingeniería las líneas de células hospedadoras de la presente invención. En una realización preferida, células CHO, células BHK, células NSO y células SP2/0. Típicamente, tales líneas de células se modifican por ingeniería para comprender adicionalmente al menos un ácido nucleico transfectado que codifica una molécula de anticuerpo entera, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización alternativa, se utiliza una línea de células de hibridoma que expresa un anticuerpo particular de interés como línea de células sustrato a fin de generar las células hospedadoras modificadas por ingeniería de la invención.
- 40 45 Típicamente, al menos un ácido nucleico en el sistema de la célula hospedadora codifica GnT-III. Sin embargo, pueden emplearse asimismo otros tipos de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas en el sistema hospedador, típicamente además de GnT-III, con inclusión de GaIT, y Man II. Típicamente, al menos un ácido nucleico en el sistema de la célula hospedadora codifica GnT-III. Sin embargo, pueden emplearse asimismo otros tipos de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas en el sistema hospedador, típicamente además de GnT-III, con inclusión de GaIT, y Man II.
- 50 Uno o varios ácidos nucleicos codificantes de una glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas puede(n) expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, o alternativamente, un sistema de expresión regulado.
- 55 60 Sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión con conmutador lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión de metalotioneína inducible por metal. Si varios ácidos nucleicos diferentes codificadores de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas están comprendidos dentro del sistema de la célula hospedadora, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles óptimos de expresión serán diferentes para cada proteína de interés, y se determinarán utilizando experimentación de rutina. Los niveles de expresión se determinan por métodos conocidos generalmente en la técnica, con inclusión de análisis por transferencia western utilizando un anticuerpo

específico de glicosil-transferasa, análisis por transferencia northern utilizando una sonda de ácido nucleico específico de glicosil-transferasa, o medida de la actividad enzimática. Alternativamente, puede emplearse una lectina que se fija a los productos de biosíntesis de la glicosil-transferasa, por ejemplo, la lectina E₄-PHA. En otra alternativa, el ácido nucleico puede estar enlazado operativamente a un gen informador; los niveles de expresión de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas se determinan por medida de una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen informador. El gen informador puede transcribirse junto con el o los ácidos nucleicos que codifican dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas como una sola molécula de mRNA; sus secuencias codificantes respectivas pueden estar enlazadas sea por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o por un mejorador de la traducción independiente de la cápsula (CITE). El gen informador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas de tal modo que se forme una sola cadena polipeptídica. El ácido nucleico que codifica la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas puede estar enlazado operativamente al gen informador bajo el control de un solo promotor, de tal modo que el ácido nucleico que codifica la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas y el gen informador se transcriben en una molécula de RNA que sufre alternativamente remodelación en dos moléculas de RNA mensajero (mRNA) separadas; uno de los mRNAs resultantes se traduce en dicha proteína informadora, y el otro se traduce en dicha glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas.

Si se expresan varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas, los mismos pueden estar dispuestos de tal manera que se transcriban como una sola o como varias moléculas de mRNA. Si aquéllos se transcriben como una sola molécula de mRNA, sus secuencias codificantes respectivas pueden estar enlazadas sea por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o por un mejorador de la traducción independiente de la cápsula (CITE). Los mismos pueden transcribirse a partir de un solo promotor en una molécula de RNA que sufre alternativamente remodelación en varias moléculas de RNA mensajero (mRNA) separadas, cada una de las cuales se traduce luego en su respectiva glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas codificada.

1. Sistemas de Expresión

Métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas y señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas *in vitro* de DNA recombinante, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo/recombinación genética*. Véanse por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y.

Pueden utilizarse una diversidad de sistemas hospedador-vector de expresión para expresar la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas. Preferiblemente, se utilizan células de mamífero como sistemas de células hospedadoras transfectados con vectores de expresión recombinantes de DNA plasmídico o DNA de cósmido que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas. Muy preferiblemente, se utilizan como sistemas de células hospedadoras células CHO, células BHK, células NSO, o células SP2/0, o alternativamente, células de hibridoma. En realizaciones alternativas, pueden contemplarse otros sistemas de células hospedadoras eucariotas, que incluyen células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (v.g., baculovirus) que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas; sistema de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (v.g., el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (v.g., el plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas; o sistemas de células animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (v.g., adenovirus, virus Vaccinia) que incluyen líneas de células modificadas por ingeniería que contienen copias múltiples del DNA codificador de la proteína de interés y la secuencia codificante la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas amplificada de manera estable (CHO/dhfr) o amplificada de manera inestable en microcromosomas dobles (v.g., líneas de células de murino).

En cuanto a los métodos de esta invención, se prefiere por regla general la expresión estable a la expresión transitoria, dado que aquella consigue típicamente resultados más reproducibles y es además más susceptible de producción en gran escala. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales,

las células hospedadoras pueden transformarse con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por elementos de control de la expresión apropiados (v.g., promotor, intensificador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del DNA extraño, las células modificadas por ingeniería pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, 5 después de lo cual se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que tienen integrado de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas de células.

- 10 Pueden utilizarse varios sistemas de selección que incluyen, pero sin carácter limitante, los genes de timidina-quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), fosforribosiltransferasa hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, 1962. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:817), que pueden emplearse en células tk^r, hgprt^r o aprt^r, respectivamente. Asimismo, puede utilizarse 15 la resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los genes dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofénólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicosido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e 20 hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histidol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047); el sistema glutamina-sintasa; y ODC (ornitina-descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina-descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

25 2. Identificación De Transfectantes O Transformantes Que Expresan La Proteína Que Tiene Un Patrón De Glicosilación Modificado

Las células hospedadoras que contienen la secuencia codificante y que expresan los productos génicos 30 biológicamente activos pueden identificarse por al menos cuatro enfoques generales; (a) hibridación DNA-DNA o DNA-RNA; (b) presencia o ausencia de funciones de genes "marcadores"; (c) evaluación del nivel de transcripción tal como se mide por la expresión de los transcritos respectivos de mRNA en la célula hospedadora; y (d) detección del producto genético como se mide por inmunoensayo o por su actividad biológica.

35 En el primer enfoque, la presencia de la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la o las glicosil-transferasas modificadoras de las glicoproteínas insertada(s) en el vector de expresión puede detectarse por sondas de hibridación DNA-DNA o DNA-RNA que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias codificantes respectivas, respectivamente, o porciones o derivados de las mismas.

40 En el segundo enfoque, el sistema vector de expresión recombinante/hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones de genes "marcadores" (v.g., actividad de timidina-quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas se insertan en una secuencia de 45 genes marcadores del vector, los recombinantes que contienen las secuencias codificantes respectivas pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador puede disponerse en tandem, con las secuencias codificantes bajo el control del mismo o diferente promotor utilizado para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas.

50 En el tercer enfoque, la actividad de transcripción para la región codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas puede evaluarse por ensayos de hibridación.

55 Por ejemplo, puede aislar y analizarse el RNA por transferencia northern utilizando una sonda homóloga a las secuencias codificantes de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas o porciones particulares de la misma. Alternativamente, los ácidos nucleicos totales de la célula hospedadora pueden extraerse y ensayarse respecto a la hibridación de dichas sondas.

60 En el cuarto enfoque, la expresión de los productos proteínicos de la proteína de interés y la secuencia codificante de la glicosil-transferasa modificadora de las glicoproteínas pueden evaluarse inmunológicamente, por ejemplo por transferencias western, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, inmunoensayos enlazados a enzimas

y análogos. Sin embargo, el test final del éxito del sistema de expresión implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

D. Generación Y Uso De Proteínas Y Fragmentos De Proteína Que Tienen Patrones De Glicosilación Alterados

- 5 1. Generación Y Uso De Anticuerpos Que Tienen Citotoxicidad Celular Incrementada Dependiente De Anticuerpos
- Pruebas clínicas de anticuerpos monoclonales (mAbs) no conjugados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han producido recientemente resultados alentadores. Dillman, 1997, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-225; 10 Deo et al., 1997, Immunology Today 18:127. Una IgG1 quimérica no conjugada ha sido aprobada para el linfoma de grado bajo o folicular de las células B no-Hodgkin (Dillman, 1997, *arriba*), mientras que otro mAb no conjugado, una IgG1 humanizada dirigida a tumores de mama sólidos, ha exhibido también resultados prometedores en pruebas clínicas de fase III. Deo et al., 1997, *arriba*. Los antígenos de estos dos mAbs se expresan fuertemente en sus 15 células tumorales respectivas y los anticuerpos median la destrucción potente del tumor por células efectoras *in vitro* e *in vivo*. En contraste, muchos otros mAbs no conjugados con especificidades tumorales sutiles no pueden desencadenar funciones efectoras de potencia suficiente para ser clínicamente útiles. Frost et al., 1997, Cancer 80:317-333; Surfus et al., 1996 J. Immunother. 19: 184-191. Para algunos de estos mAbs más débiles, se está 20 testando actualmente terapia adjunta con citoquinas. La adición de citoquinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por aumento de la actividad y el número de linfocitos circulantes. Frost et al., 1997, *arriba*; Surfus et al., 1996, *arriba*. La ADCC, un ataque lítico sobre células diana de anticuerpos, se desencadena después de la fijación de receptores linfocíticos a la región constante (Fc) de los anticuerpos (Deo et al., 1997, *arriba*).
- 25 Un enfoque diferente, pero complementario, para aumentar la actividad de ADCC de IgG1s no conjugadas consistiría en modificar por ingeniería la región Fc del anticuerpo a fin de aumentar su afinidad para los receptores linfocíticos (FcγRs). Estudios de ingeniería de proteínas han demostrado que los FcγRs interaccionan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG. Lund et al., 1996, J. Immunol. 157: 4963-4969. Sin embargo, la fijación de FcγR requiere también la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al Asn297 conservado en la región CH2. Lund et al., 1996, *arriba*; Wright y Morrison, 1997, Tibtech 15: 26-31, lo que sugiere que el oligosacárido y el 30 polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una conformación activa del polipéptido CH2. La modificación de la estructura del oligosacárido puede explorarse por tanto como medio para aumentar la afinidad de la interacción.
- 35 Una molécula de IgG lleva dos oligosacáridos enlazados a N en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, un anticuerpo se produce como una población de glicoformas que comparten la misma cadena peptídica principal pero tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos encontrados normalmente en la región Fc de la IgG del suero son de tipo bi-antenario complejo (Wormald et al., 1997, Biochemistry 36: 130-1380), con nivel bajo de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc), y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación central (FIGURA 1). Algunos 40 estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidrato requerida para la fijación de FcγR se encuentra dentro del centro de oligosacárido. Lund et al., 1996, *arriba*. La eliminación de las galactosas terminales da como resultado aproximadamente una reducción de dos veces en la actividad de ADCC, lo que indica un papel de estos residuos en la fijación del receptor de FcγR. Lund et al., 1996 *arriba*.
- 45 Las líneas de células derivadas de ratón o hámster utilizadas en la industria y en estudios académicos para producción de mAbs terapéuticos no conjugados fijan normalmente los determinantes de oligosacáridos requeridos a sitios Fc. Las IgGs expresadas en estas líneas de células carecen, sin embargo, de la GlcNAc bisectante encontrada en bajas cantidades en las IgGs del suero. Lifely et al., 1995, Glycobiology 318:813-822. En contraste, se ha observado recientemente que una IgG1 humanizada (CAMPATH-1H) producida en mieloma de rata llevaba una 50 GlcNAc bisectante en algunas de sus glicoformas. Lifely et al., 1995, *arriba*. El anticuerpo derivado de células de rata alcanzaba una actividad de ADCC *in vitro* similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas de células estándar, pero a concentraciones de anticuerpo significativamente menores.
- 55 El antígeno CAMPATH está presente normalmente a niveles altos en las células de linfoma, y este mAb químérico tiene actividad de ADCC alta en ausencia de una GlcNAc bisectante. Lifely et al., 1995, *arriba*. Aun cuando en el estudio de Lifely et al., 1995, *arriba*, la actividad de ADCC máxima *in vitro* no se incrementaba por alteración del patrón de glicosilación, el hecho de que este nivel de actividad se obtuvo a concentraciones de anticuerpo relativamente bajas para el anticuerpo portador de los oligosacáridos bisecionados sugiere un papel importante para los oligosacáridos bisecionados. Se desarrolló un enfoque para aumentar la actividad de ADCC de IgG1s con niveles de actividad basal bajos por producción de glicoformas de estos anticuerpos portadores de oligosacáridos bisecionados en la región Fc.

En el camino de glicosilación enlazado a N, una GlcNAc bisectante es añadida por la enzima $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminiltransferasa III (GnT-III). Schachter, 1996, Biochem. Cell. Biol. 64:163-181. Lifely et al., 1995, arriba, obtuvieron patrones de glicosilación diferentes del mismo anticuerpo produciendo el anticuerpo en líneas de células diferentes con maquinarias de glicosilación distintas pero no modificadas por ingeniería, que incluían una línea de células de mieloma de rata que expresaba GnT-III a un nivel endógeno constante. En contraste, los autores de la presente invención utilizaron una sola línea de células CHO productora de anticuerpos, que se había modificado previamente por ingeniería para expresar, de una manera regulada externamente, diferentes niveles de un gen GnT-III clonado. Este enfoque permitió a los autores de la presente invención establecer por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnT-III y la actividad de ADCC del anticuerpo modificado.

Como se demuestra en esta memoria, Véase el EJEMPLO 4 más adelante, el anticuerpo C2E8 modificado de acuerdo con el método expuesto tenía una actividad de ADCC aproximadamente diecisésis veces mayor que el anticuerpo estándar C2B8 sin modificar producido en condiciones idénticas de cultivo de células y purificación.

Resumidamente, una muestra del anticuerpo C2B8 expresada en células CHO-tTA-C2B8 que no exhiben expresión de GnT-III exhibía una actividad citotóxica de aproximadamente 31% (a concentración de 1 μ g/ml de anticuerpo), medida como lisis *in vitro* de células SB (CD20+) por linfocitos humanos. En contraste, el anticuerpo C2B8 derivado de un cultivo de células CHO que expresaban GnT-III a un nivel basal reprimido en gran parte exhibía a una concentración de anticuerpo de 1 μ g/ml, un aumento de 33% en la actividad de ADCC contra el control para la misma concentración de anticuerpo. Además, el aumento de la expresión de GnT-III producía un gran aumento de casi 80% en la actividad de ADCC máxima (para concentración de anticuerpo de 1 μ g/ml) comparado con el control para la misma concentración de anticuerpo (véase el Ejemplo 4 más adelante).

Se describen asimismo en esta memoria anticuerpos que tienen una citotoxicidad celular incrementada dependiente de anticuerpos con inclusión de, pero sin carácter limitante, el anticuerpo monoclonal anti-neuroblastoma humano (chCE7), un anticuerpo monoclonal químérico anti-carcinoma de las células renales humano (ch-G250), un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado, un anticuerpo monoclonal químérico anti-carcinoma de colon, pulmón y mama humano (ING-1), un anticuerpo monoclonal humanizado anti-antígeno 17-1 A humano (3622W94), un anticuerpo humanizado anti-tumor colorrectal humano (A33), un anticuerpo anti- melanoma humano (R24) dirigido contra el gangliósido GD3, y un anticuerpo monoclonal químérico anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25).

2. Generación Y Uso De Proteínas De Fusión Que Comprenden Una Región Equivalente A Una Región Fc De Una Inmunoglobulina Que Promueven Citotoxicidad Mediada Por Fc

Como se ha expuesto anteriormente, y se describe en esta memoria un método para mejora de la actividad de ADCC de anticuerpos terapéuticos. Esto se consigue modificando por ingeniería el patrón de glicosilación de la región Fc de tales anticuerpos, en particular por maximización de la proporción de moléculas de anticuerpo que llevan oligosacáridos complejos biseccionados enlazados en N a los sitios de glicosilación conservados en sus regiones Fc. Esta estrategia puede aplicarse para mejorar la citotoxicidad celular mediada por Fc contra células indeseables mediadas por cualquier molécula que lleve una región que es equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, no sólo por anticuerpos terapéuticos, dado que los cambios introducidos por la modificación mediante ingeniería de la glicosilación afectan únicamente a la región Fc y por consiguiente a sus interacciones con los receptores Fc en la superficie de las células efectoras implicadas en el mecanismo de la ADCC. Las moléculas que contienen Fc a las que se pueden aplicar los métodos expuestos en esta memoria incluyen, pero sin carácter limitante, (a) proteínas de fusión solubles constituidas por un dominio de proteína de direccionamiento fusionado al término N de una región Fc (Chamov y Ashkenazi, 1996 TIBTECH 14:52) y (b) proteínas de fusión ancladas a la membrana plasmática constituidas por un dominio transmembranal tipo II que está localizado en la membrana plasmática fusionada al término N de una región Fc (Stabila, P.F., 1998, Nature Biotech. 16: 1357).

En el caso de las proteínas de fusión solubles (a), el dominio de direccionamiento dirige la fijación de la proteína de fusión a células indeseables tales como células de cáncer, es decir, de una manera análoga a los anticuerpos terapéuticos. La aplicación del método expuesto en esta memoria para mejorar la actividad citotóxica celular mediada por Fc mediada por estas moléculas sería por tanto idéntica al método aplicado para anticuerpos terapéuticos.

En el caso de las proteínas de fusión ancladas a la membrana (b), las células indeseables en el cuerpo tienen que expresar el gen que codifica la proteína de fusión. Esto puede conseguirse sea por enfoques de terapia génica, es decir, por transfección de las células *in vivo* con un plásmido o vector viral que dirige la expresión del gen codificante de la proteína de fusión a células indeseables, o por implantación en el cuerpo de células modificadas genéticamente por ingeniería para expresar la proteína de fusión en su superficie. Las últimas células se

implantarían normalmente en el cuerpo dentro de una cápsula de polímero (terapia de células encapsuladas) donde las mismas no pueden ser destruidas por un mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc. Sin embargo, en caso de que el dispositivo de cápsula falle y las células que se escapan lleguen a hacerse indeseables, entonces las mismas pueden eliminarse por citotoxicidad celular mediada por Fc. Stabila et al., 1998, Nature Biotech. 16: 1357.

5 En este caso, el método expuesto en esta memoria podría aplicarse sea por incorporación en el vector de terapia génica de una casete de expresión génica adicional que dirija los niveles de expresión adecuados u óptimos de GnT-III o por manipulación mediante ingeniería de las células a implantar para expresar niveles adecuados u óptimos de GnT-III. En ambos casos, la finalidad del método expuesto es aumentar o maximizar la proporción de 10 regiones Fc presentadas en la superficie que lleven oligosacáridos complejos biseccionados.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle. Las preparaciones y ejemplos siguientes se dan a fin de permitir a los expertos en la técnica comprender y practicar más claramente la presente invención.

15 VII. EJEMPLOS

A. Ejemplo 1: Sobreexpresión De Glicosil-Transferasas Regulada Por Tetraciclina En Células De Ovario De Hámster Chino

20 Para establecer una línea de células en la cual la expresión de GnT-III pudiera controlarse externamente, se utilizó un sistema de expresión regulado por tetraciclina. Gossen, M. y Bujard, H. 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551. La cantidad de GnT-III en estas células podía controlarse simplemente por manipulación de la concentración de tetraciclina en el medio de cultivo. Utilizando este sistema, se encontró que la sobreexpresión de 25 GnT-III a niveles altos conducía a inhibición del crecimiento y era tóxica para las células. Otra línea de células CHO con sobreexpresión de GnT V reguladas por tetraciclina, una glicosil-transferasa distinta modificadora de las glicoproteínas, exhibía el mismo efecto inhibidor, lo que indicaba que ésta puede ser una característica general de la sobreexpresión de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas. Este fenómeno no ha sido publicado previamente, debido probablemente al hecho de que los investigadores han utilizado por regla general promotores constitutivos para experimentos afines. El efecto de crecimiento establece un límite superior al nivel de la 30 sobreexpresión de glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas, y puede limitar también por tanto la extensión máxima de la modificación de sitios de glicosilación difícilmente accesibles.

1. Materiales y Métodos

35 Establecimiento De Células CHO Con Regulación Por Tetraciclina

Expresión De Glicosiltransferasas. En un primer paso, se generó inicialmente una línea de células CHO intermedia (CHO-tTA) que expresa constitutivamente un transactivador (tTA) controlado por tetraciclina a un nivel para el adecuado para el sistema de regulación. Usando el reactivo Lipofectamina (Gibco, Eggenfelden, Alemania), las 40 células CHO (DUKX) se co-transfectaron con *pUHD15-1*, un vector para expresión constitutiva del gen tTA (Gossen y Bujard, 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551), y *pSV2Neo*, un vector para expresión constitutiva de un gen de resistencia a neomicina (Clontech, Palo alto, CA). Se seleccionaron clones estables, resistentes a los fármacos y se criaron respecto a niveles adecuados de expresión de tTA por transfecciones transitorias con un vector de expresión de β-galactosidasa regulado por tetraciclina, *pUHG16-3*. Se añadió DNA codificador del epítope C-myc al extremo 3' del cDNA de GnT-III de rata (Nishikawa et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:18199-18204) por amplificación PCR. Nilsson et al., 1993, J. Cell Biol. 120: 5-13. El producto se secuenció y se subclonó en *pUHD10-3*, un vector para expresión regulada por tetraciclina (Gossen y Bujard, arriba) para generar el vector *pUHD10-3-GnTIIIm*. El cDNA de GnT V humano (Saito et al., 1995, Eur. J. Biochem. 233: 18-26), se subclonó directamente en *pUHD10-3* para generar el vector de plásmido *pUHD10-3-GnTV*. Las células CHO-tTA se co-transfectaron 45 utilizando un método de transfección con fosfato de calcio (Jordan y Wurm, 1996, Nucleic Acids Res. 24: 596-601), con *pPUR*, un vector para expresión constitutiva de resistencia a la puromicina (Clontech, Palo Alto, CA), y el vector *pUHD10-3-GnTIIIm* o el vector *pUHD10-3-GnTV*. Los clones resistentes a la puromicina se seleccionaron en presencia de tetraciclina, se aislaron y se analizaron luego respecto a expresión regulada por tetraciclina de GnT-III o GnT V por análisis mediante transferencias western. Véase más adelante.

55 Transferencias Western Y De Lectina. Para el análisis por transferencia western de GnT-III o GnT V, se separaron lisados de células por SDS-PAGE y se pasaron por electrotransferencia a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA). GnT-III se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (Nilsson et al., 1993, J. Cell Biol. 120: 5-13) y GnT V utilizando un anticuerpo políclonal de conejo anti-GnT V (Chen et al., 1995, Glycoconjugate J. 12: 813-823). Como anticuerpo secundario se utilizó peroxidasa de rábano picante anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo

(Amerhsam, Arlington, IL). El anticuerpo secundario fijado se detectó utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado (kit ECL, Amersham, Arlington, IL).

Para el análisis por transferencia de lectina de las glicoproteínas modificadas mediante reacciones catalizadas por GnT-III o GnT V, se utilizaron E-PHA biotinilada (Oxford Glycosciences, Oxford, Reino Unido) o L-PHA-digoxigenina (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), respectivamente. Merkle y Cummings, 1987, Methods Enzymol. 138: 232-259.

2. Resultados y Discusión

Establecimiento De Líneas De Células CHO Con Sobreexpresión De Glicosil-Transferasas Regulada Por Tetraciclina. La estrategia utilizada para el establecimiento de líneas de células que sobreexpresaban glicosil-transferasa consistió en generar primeramente una línea de células CHO intermedia que expresaba constitutivamente el transactivador controlado por tetraciclina (tTA) a un nivel adecuado para el funcionamiento del sistema. Yin et al., 1996, Anal. Biochem. 235: 195-201. Este nivel tenía que ser suficientemente alto para activar niveles de transcripción elevados, en ausencia de tetraciclina, a partir de la corriente promotora mínima de los genes de glicosil-transferasa. Se co-transfектaron células CHO con un vector para expresión constitutiva de tTA, impulsada por el promotor/intensificador del citomegalovirus humano (hCMV), y un vector para expresión del gen de resistencia a la neomicina (Neo^R). Se utilizó un exceso del vector de expresión tTA y se aislaron clones resistentes a neomicina.

En las células de mamífero, el DNA co-transfектado se integra adyacentemente en localizaciones aleatorias en el interior de los cromosomas, y la expresión depende en gran parte del sitio de integración así como del número de copias de casetes de expresión intactas. Se genera una población mixta de clones con niveles de expresión diferentes de los genes transfectados. Yin et al., 1996, arriba. La selección para la resistencia a neomicina selecciona meramente en cuanto a integración de una casete de expresión Neo^R intacta, mientras que el uso de un exceso del vector de expresión tTA aumenta la probabilidad de encontrar clones con expresión satisfactoria de tTA.

La población mixta de clones tiene que cribarse utilizando un ensayo funcional para la expresión de tTA. Gossen y Bujard, 1992, arriba; Yin et al., 1996, arriba. Esto se hizo por transfección de cada clon con un segundo vector que albergaba un gen informador, *lacZ*, bajo el control del promotor tet y cribado respecto a expresión transitoria regulada por tetraciclina (tet-regulada), (a saber, 1 a 3 días después de la transfección) de actividad de β -galactosidasa. Se seleccionó para trabajo ulterior CHOt17, que exhibía el nivel máximo de actividad de β -galactosidasa tet-regulada entre 20 clones cribados.

Se testaron las células CHOt17 respecto a la expresión tet-regulada de GnT-III por transfección de las células con el vector pUHD10-3-GnTIIIm y comparación de los niveles relativos de GnT-III después de incubación de las células en presencia y ausencia de tetraciclina durante 36 h. Se compararon los niveles de GnT-III por análisis mediante transferencia western, utilizando un anticuerpo monoclonal (9E10) que reconoce el marcador epítópico del péptido c-myc en el término carboxi de GnT-III. El marcador se había introducido por una modificación del gen de glicosil-transferasa utilizando amplificación por PCR. Diversos informes han demostrado la adición de marcadores epítópicos peptídicos a los términos carboxi de las glicosil-transferasas, un grupo de enzimas que comparten la misma topología, sin disrupción de la localización o actividad. Nilsson et al., 1993, arriba; Rabouille et al., 1995, J. Cell Science 108: 1617-1627. La FIGURA 2 muestra que en el clon CHOt17 la acumulación de GnT-III es significativamente mayor en ausencia que en presencia de tetraciclina. Se testó en paralelo un clon adicional, CHOt2, que proporcionaba una activación más débil de la transcripción en el ensayo de actividad de β -galactosidasa (FIGURA 2). Los niveles de expresión de GnT-III y β -galactosidasa siguen el mismo patrón de regulación por tetraciclina para estos dos clones. Se encontró que el rango de concentraciones de tetraciclina en el que la expresión de GnT-III puede ser controlada cuantitativamente es desde 0 a 100 ng/ml (FIGURA 3). Este resultado está de acuerdo con investigaciones previas que utilizaron líneas de células y genes diferentes (Yin et al., 1996, arriba).

Para generar una línea de células estable con expresión de GnT-III regulada por tet, se transfecaron células CHOt17 con el vector pUHD10-3-GnT-IIIm y el vector *pPUR*, para expresión de un gen de resistencia a puromicina.

En paralelo, se co-transfектaron células CHOt17 con los vectores pUHD10-3-GnT V y *pPUR* para generar una línea de células análoga para esta otra glicosil-transferasa. Se utilizó un método muy eficiente de transfección con fosfato de calcio y se linealizó el DNA en sitios de restricción singulares fuera de las casetes de expresión eucariotas, a fin de disminuir la probabilidad de disrupción de éstas después de la integración. Por utilización de un hospedador en el cual se había demostrado primeramente que los niveles de tTA expresados eran adecuados, aumenta la probabilidad de encontrar clones con expresión alta de las glicosil-transferasas en ausencia de tetraciclina.

Se seleccionaron integrantes estables por resistencia a la puromicina, manteniendo tetraciclina en el medio durante toda la selección de los clones a fin de mantener la expresión de glicosil-transferasas a niveles basales. Para cada glicosil-transferasa se cultivaron 16 clones resistentes a puromicina en presencia y ausencia de tetraciclina, y se analizaron 8 en cada caso por análisis mediante transferencia western (FIGURA 4). La mayoría de los clones exhibían una regulación satisfactoria de la expresión de glicosil-transferasa. Uno de los clones que expresaban GnT-III exhibía un nivel basal relativamente alto en presencia de tetraciclina (FIGURA 4B, clon 3), lo que sugiere la integración de la casete de expresión próxima a un intensificador endógeno de las células CHO; mientras que dos clones resistentes a puromicina no exhibían expresión alguna de GnT-III en ausencia de tetraciclina (FIGURA 4B, clones 6 y 8). Entre los clones que exhibían regulación satisfactoria de la expresión, se observaron niveles máximos diferentes de glicosil-transferasa. Esto puede ser debido a variaciones en el sitio de integración o el número de copias integradas. La actividad de las glicosil-transferasas se verificó por fijación de las lectinas E-PHA y L-PHA a glicoproteínas celulares endógenas derivadas de diversos clones que se dejaron crecer en presencia y ausencia de tetraciclina (FIGURA 5). Las lectinas son proteínas que se fijan a estructuras de oligosacáridos específicas. La lectina E-PHA se fija a oligosacáridos biseccionados, los productos de reacciones catalizadas por GnT-III, y L-PHA se fija a oligosacáridos tri- y tetra-antenarios producidos por reacciones catalizadas por GnT V (Merkle y Cummings, 1987, Methods Enzymol. 138: 232-259). Para cada glicosil-transferasa, un clon con expresión elevada en ausencia, pero con expresión indetectable en presencia de tetraciclina (clon 6, FIGURA 4A, CHO-tet-GnT V, y clon 4, FIGURA 4B, CHO-tet-GnT-III^m) se seleccionó para el trabajo ulterior.

20 B. Ejemplo 2: Inhibición Del Crecimiento Celular Efectuada Por La Sobreexpresión De Glicosil-Transferasas

Durante el cribado de los clones que expresaban GnT-III y GnT V en ausencia de tetraciclina, véase el Ejemplo 1, arriba, aproximadamente la mitad de cada serie de clones exhibían una fuerte inhibición del crecimiento. La magnitud de inhibición del crecimiento variaba entre los clones, y la comparación con los niveles de expresión estimados a partir de análisis por transferencia western (FIGURA 4) sugería una correlación entre el grado de inhibición del crecimiento y la sobreexpresión de glicosil-transferasas. Esta correlación se estableció firmemente por cultivo de los clones finales, CHO-tet-GnT-III^m y CHO-tet-GnT V, en concentraciones diferentes de tetraciclina. Una fuerte inhibición del crecimiento era evidente después de dos días de cultivo a niveles bajos de tetraciclina (FIGURA 6). Las células cuyo crecimiento se veía inhibido presentaban una morfología pequeña y redondeada en lugar de la forma típica extendida de las células CHO adherentes. Después de unos cuantos días, era evidente una muerte celular significativa por la morfología de las células con crecimiento inhibido.

35 La inhibición del crecimiento debida a la sobreexpresión de glicosil-transferasas no ha sido publicada hasta ahora en la bibliografía, debido probablemente al uso muy extendido de promotores constitutivos. Dichos clones que aportan una expresión constitutiva de una glicosil-transferasa a niveles que inhiben el crecimiento, se perderían durante el procedimiento de selección. Esto se evitó en este caso por mantenimiento de tetraciclina en el medio, es decir, niveles de expresión basal, durante toda la selección. Antes de la selección, se podía expresar que la frecuencia de clones capaces de expresar glicosil-transferasas a niveles inhibidores del crecimiento utilizando vectores tradicionales de mamífero basados en el promotor/intensificador constitutivo hCMV fuera menor. Esto se debe al hecho de que, para cualquier gen dado, el vector pUHD10-3 en las líneas de células CHO seleccionadas para niveles constitutivos altos de tTA, produce niveles de expresión significativamente mayores que los vectores basados en el promotor/intensificador constitutivo hCMV, como ha sido observado por otros. Yin et al., 1996, arriba.

45 La inhibición del crecimiento celular podría ser debida a un efecto directo de sobreexpresión de glicosil-transferasas residentes en Golgi ancladas a la membrana, con independencia de su actividad catalítica *in vivo*, v.g., por plegamiento erróneo en el retículo endoplásmico (ER) causante de la saturación de elementos que ayudan al plegamiento de la proteína en el ER. Esto podría afectar posiblemente al plegamiento y la secreción de otras proteínas celulares esenciales. Alternativamente, la inhibición del crecimiento podría relacionarse con una actividad incrementada *in vivo* de la glicosil-transferasa que conduce a un cambio del patrón de glicosilación, de una manera disruptora de la función, de una serie de glicoproteínas endógenas necesarias para el crecimiento en condiciones estándar de cultivo *in vitro*.

55 Con independencia del mecanismo subyacente, el efecto de inhibición del crecimiento tiene dos consecuencias para la modificación por ingeniería de la glicosilación de células animales. En primer lugar, implica que la cotransfección de vectores de expresión constitutivos de glicosil-transferasa junto con vectores para el producto glicoproteínico diana es una estrategia deficiente. Deberían evitarse también otras vías de enlace de la expresión de estas dos clases de proteínas, v.g., por el uso de promotores constitutivos múltiples de fuerza similar o el uso de vectores de expresión constitutivos multicistrónicos. En estos casos, clones con expresión constitutiva muy fuerte de la glicoproteína diana, un requisito previo para un bioproceso económico, podrían tener también expresión elevada de la glicosil-transferasa y se eliminarían durante el proceso de selección. La expresión enlazada e inducible podría ser

también problemática para bioprocesos industriales, dado que la viabilidad de las células cuyo crecimiento se hubiera frenado se vería comprometida por la sobreexpresión de la glicosil-transferasa.

La segunda consecuencia es que ello impone un límite superior sobre la sobreexpresión de la glicosil-transferasa para los enfoques de modificación de la glicosilación por ingeniería. Evidentemente, las conversiones de muchas reacciones catalizadas por glicosil-transferasas en la célula, a los niveles endógenos de las glicosil-transferasas, son muy altas para varios sitios de glicosilación. Sin embargo, existen también sitios de glicosilación en los que los oligosacáridos están un tanto inaccesibles o están estabilizados en conformaciones desfavorables para glicosil-transferasas específicas. Por ejemplo, se ha observado que la adición de Glc-NAc bisectante está más restringida a los oligosacáridos fijados a la región Fc que a los localizados en las regiones variables de anticuerpos IgG humanos. Savvidou *et al.*, 1984, Biochemistry 23: 3736-3740. La modificación por ingeniería de la glicosilación de estos sitios restringidos podría verse afectada por dicho límite en la expresión de las glicosil-transferasas. Aunque esto podría implicar un intento de una distribución "artificial" de las glicoformas, éstas podrían ser beneficiosas para aplicaciones terapéuticas especiales de las glicoproteínas.

C. Ejemplo 3: Modificación Por Ingeniería De La Glicosilación De Un Anticuerpo Anti-Neuroblastoma Humano En Células De Ovario De Hámster Chino

Con objeto de validar el concepto de la modificación por ingeniería de un anticuerpo terapéutico por modificación de su patrón de glicosilación, se seleccionó una IgG1 quimérica anti-neuroblastoma humano (chCE7) que tiene actividad de ADCC insignificante cuando es producida por células de mieloma de ratón recombinantes SP2/0. ChCE7 reconoce una glicoproteína de membrana de 190 kDa asociada a un tumor y reacciona fuertemente con todos los tumores de neuroblastoma testados hasta la fecha. La misma tiene una afinidad alta para su antígeno (K_d de $10^{10} M^{-1}$) y, debido a su alta especificidad de tumor, se utiliza rutinariamente como herramienta de diagnóstico en patología clínica. Amstutz *et al.*, 1993, Int. J. Cancer 53: 147-152. En estudios recientes, se ha demostrado que chCE7 radiomarcado exhibe una localización tumoral satisfactoria en pacientes humanos. Dürr, 1993, Eur. J. Nucl. Med. 20: 858. El patrón de glicosilación de chCE7, un anticuerpo monoclonal (mAb) terapéutico anti-neuroblastoma se modificó por ingeniería en células CHO con expresión de GnT-III regulada por tetraciclina. Se produjo una serie de muestras de mAb que diferían en su distribución de glicoformas por control de la expresión de GnT-III en un rango entre los niveles basal y tóxico, y se analizaron sus perfiles de glicosilación por MALDI-TOF/MS de oligosacáridos neutros. La medida de la actividad de ADCC de estas muestras exhibía un rango óptimo de expresión de expresión de GnT-III para actividad biológica máxima de chCE7 *in vitro*, y esta actividad estaba correlacionada con el nivel de oligosacáridos complejos bisecionados asociados a Fc.

1. Materiales y Métodos

Construcción De Vectores De Expresión De chCE7

Los vectores plasmídicos 10CE7VH y 98CE7VL, para expresión de las cadenas pesada (IgG1) y ligera (kappa), respectivamente, del anticuerpo químérico anti-neuroblastoma humano chCE7, que contienen DNA genómico químérico que incluye el promotor/intensificador de inmunoglobulina de ratón, regiones variables de anticuerpos de ratón, y regiones constantes de anticuerpo humano (Amstutz *et al.*, 1993, Int. J. Cancer 53: 147-152) se utilizaron como materiales de partida para la construcción de los vectores de expresión finales, pchCE7H y pchCE7L. Los genes químéricos de las cadenas pesada y ligera de chCE7 se reensamblaron y se subclonaron en el vector pcDNA 3.1(+). Durante el reensamblaje, se eliminaron todos los intrones, se reemplazaron las secuencias conductoras con secuencias sintéticas, Reff *et al.*, 1994, Blood 83:435-445, y se introdujeron sitios de restricción singulares que unían las secuencias de región variable y constante. Los intrones de la región pesada constante se eliminaron por remodelación con PCR de extensión por solapamiento. Clackson *et al.*, 1991, General Applications of PCR to Gene Cloning and Manipulation, p. 187-214, en: McPherson *et al.* (ed.), PCR a Practical Approach, Oxford University Press, Oxford.

Producción De chCE7 En Células CHO Que Expresan Niveles Diferentes De GnT-III. Se co-transfектaron células CHO-tet-GnT-III^m (Véase arriba) con vectores pchCE7H, pchCE7L, y pZeoSV2 (para resistencia a Zeocina (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) utilizando un método de transfección con fosfato de calcio. Los clones resistentes a Zeocina se transfirieron a una placa de cultivo de células de 96 pocillos y se ensayaron respecto a expresión de anticuerpos químéricos utilizando un ensayo ELISA específico para la región constante de IgG humana. Lifely *et al.*, 1995, arriba. Se derivaron cuatro muestras del anticuerpo chCE7 de cultivos paralelos de un clón seleccionado (CHO-tet-GnT-III^m-chCE7), cultivado en medio de cultivo de células FMX-8 complementado con 10% FCS; conteniendo cada cultivo un nivel diferente de tetraciclina y expresando por tanto GnT-III a niveles diferentes. Las células CHO-tet-GnT-III^m-chCE7 se expandieron y se preadaptaron a una concentración diferente de tetraciclina durante 7 días. Los niveles de tetraciclina eran 2000, 60, 30, y 15 ng/ml.

Purificación De Muestras Del Anticuerpo Chce7.

El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo por cromatografía de afinidad con Proteína A en una columna HiTrap de Proteína A de 1 ml (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), utilizando elución en gradiente lineal de pH 5 desde fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, 0,01% Tween 20, urea 1M, pH 7,5 (tampón A) a tampón B (tampón A sin fosfato de sodio, pH 2,5). Las muestras de chCE7 purificadas por afinidad se intercambiaron de tampón a PBS en una columna de intercambio de catión ResourceS de 1 ml (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se consideró que la pureza final era mayor que 95% por SDS-PAGE y tinción con Azul Coomassie. La concentración de cada muestra se estimó a partir de la absorbancia a 280 nm.

10 Fijación De Anticuerpos A Células De Neuroblastoma. Se estimó la afinidad de fijación a las células de neuroblastoma humano a partir del desplazamiento de chCE7 marcado con ^{125}I por las muestras producidas por CHO. Amstutz et al., 1993, Int. arriba.

15 Análisis De Oligosacáridos Por MALDI-TOF/MS. Se trataron muestras de CE7-2000t, -60t, -30t, y 15t con sialidasa de *A. urefaciens* (Oxford Glycosciences, Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar cualesquiera residuos de monosacáridos de ácido siálico. Los productos diferidos con sialidasa se trataron luego con N-glicosidasa F peptídica (PNGaseF, Oxford Glycosciences, Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, para liberar los oligosacáridos enlazados a N. La proteína, los detergentes, y las sales 20 se eliminaron por paso de los materiales digeridos a través de microcolumnas que contenían, de arriba abajo, 20 ml de matriz de fase inversa SepPak C18 (Waters, Milford, MA), 20 ml de matriz de intercambio de cationes Dowex AG 50W X8 (BioRad, Hercules, CA), y 20 ml de matriz de intercambio de aniones AG 4X4 (BioRad, Hercules, CA). Las microcolumnas se prepararon por relleno de las matrices en una punta Gel Loader (Eppendorf, Basilea, Suiza), llena con etanol, seguido por equilibración con agua. Küster et al., 1997, Anal. Biochem. 250:82-101. El líquido de flujo 25 continuo y un lavado con 300 ml de agua se reunieron, se filtraron, se evaporaron a sequedad a la temperatura ambiente, y se resuspendieron en 2 ml de agua desionizada. Se aplicó 1 microlitro a una placa de muestra MALDI-MS (Perseptive Biosystems, Farmington, MA) y se mezcló con 1 ml de una solución de 10 mg/ml de ácido deshidrobenzoico (DHB, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) en acetona. Las muestras se secaron al aire y los cristales resultantes se disolvieron en 0,2 ml de etanol y se dejaron recristalizar por secado al aire. Harvey, 1993, 30 Rapid Mass. Spectrom. 7: 614-619. Las muestras de oligosacáridos se analizaron luego por espectrometría de masas láser ionización/desorción asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS) utilizando un espectrómetro Elite Voyager 400 (Perseptive Biosystems, Farmington, MA), equipado con una fuente de iones MALDI con extracción de iones retardada, en modo de ion positivo y modo reflector, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se promediaron 128 escaneos. Las estructuras biseccionadas de oligosacáridos complejos bi-antenarios se asignaron a 35 picos asociados a cinco HexNAc. No se han encontrado nunca en la región Fc de IgGs oligosacáridos enlazados a N no biseccionados tri-antenarios, que son los isómeros alternativos que contienen cinco HexNAc, y sus síntesis son catalizadas por glicosiltransferasas discretas de GnT-III.

40 Ensayo De Actividad De ADCC. La lisis de células de neuroblastoma humano IMR-32 (diana) por los linfocitos humanos (efector), a una ratio diana: efector de 1:19, durante una incubación de 16 horas a 37°C en presencia de concentraciones diferentes de muestras de chCE7, se midió por retención de un tinte fluorescente. Kolber et al., 1988, J. Immunol. Methods 108: 255-264. Se marcaron células IMR-32 con el tinte fluorescente Calcein AM durante 20 min (concentración final 3,3 μM). Las células marcadas (80.000 células/pocillo) se incubaron durante 1 hora con concentraciones diferentes de anticuerpo CE7. A continuación, se añadieron células mononucleares empobrecidas 45 en monocitos (1.500.000 células/pocillo) y la mezcla de células se incubó durante 16 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se desecharon el sobrenadante, y las células se lavaron una sola vez con HBSS y se lisaron en Triton X-100 (0,1%). La retención del tinte fluorescente en las células IMR-32 se midió con un fluorómetro (Perkin Elmer, Luminiscente Spectrometer LS 50B (Foster City, CA) y se calculó la lisis específica con relación a un control de lisis total, resultante de la exposición de la diana a un detergente en lugar de exposición al anticuerpo. La señal en ausencia de anticuerpo se ajustó a 0% de citotoxicidad. Cada concentración de anticuerpo se analizó por triplicado, y el ensayo se repitió 3 veces por separado.

2. Resultados Y Discusión

55 Producción De chCE7 En Células CHO Que Expresan Niveles Diferentes De GnT-III. Se construyeron vectores de expresión de las cadenas pesada y ligera de chCE7 incorporando el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), las secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, y eliminando todos los intrones de las cadenas pesada y ligera. Este diseño de vector estaba basado en informes de expresión reproducible de alto nivel de genes IgG recombinantes en células CHO. Reff et al., 1994, arriba; Trill et al., 1995, Current Opinion Biotechnol. 6: 553-560. Adicionalmente, se introdujo un sitio de restricción singular en cada cadena, en la unión entre las regiones variable y constante. Estos sitios conservan el marco de lectura y no cambian la secuencia de 60

aminoácidos. Los mismos deberían hacer posible el intercambio simple de las regiones variables de ratón, para la producción de otros anticuerpos quiméricos ratón-humano. Reff *et al.*, 1994, *arriba*. La secuenciación del DNA confirmó que los genes deseados estaban ensamblados adecuadamente, y la producción del anticuerpo químico en células CHO transfectadas se comprobó con un ensayo Fc humano-ELISA.

- 5 Células CHO-tet-GnT-III^m-chCE7, con expresión estable de GnT-III regulada por tetraciclina y expresión constitutiva estable de chCE7 se establecieron y se aumentaron a escala para producción de una serie de muestras de chCE7.
- 10 Durante el aumento a escala, se dejaron crecer 4 cultivos paralelos derivados del mismo clón CHO, cada uno a un nivel diferente de tetraciclina y que diferían por tanto solamente en el nivel de expresión del gen GnT-III. Este procedimiento elimina cualesquier efectos clonales de otras variables que afecten a la biosíntesis de las glicoformas enlazadas a N, permitiendo que se establezca una correlación rigurosa entre la expresión del gen GnT-III y la actividad biológica del anticuerpo glicosilado. La concentración de tetraciclina estaba comprendida entre 2000 ng/ml, es decir, el nivel basal de expresión de GnT-III, hasta 15 ng/ml, para el cual se observó una inhibición significativa del crecimiento y toxicidad debida a la sobreexpresión de glicosil-transferasas (*véase arriba*). De hecho, únicamente pudo recuperarse una pequeña cantidad de anticuerpo del último cultivo. El segundo nivel más alto de expresión de GnT-III, utilizando tetraciclina a una concentración de 30 ng/ml, produjo únicamente una inhibición suave del crecimiento. El rendimiento de anticuerpo purificado de este cultivo era aproximadamente 70% del correspondiente a los dos niveles inferiores restantes de sobreexpresión del gen GnT-III.
- 15 20 Las 4 muestras de anticuerpo, CE7-2000t, -60t, -30t, y -15t, números que designan la concentración de tetraciclina asociada, se purificaron por cromatografía de afinidad sobre Proteína A y se cambiaron de tampón a PBS utilizando una columna de intercambio de catión. La pureza era mayor que 95% a juzgar por SDS-PAGE con tinción por Azul Coomassie. Los ensayos de fijación a las células de neuroblastoma humano revelaron afinidad alta para las células y la ausencia de diferencias importantes en la fijación de antígeno entre las diferentes muestras (las constantes de disociación en equilibrio estimadas variaban entre 2,0 y $2,7 \times 10^{10}$ M). Esto era de esperar, dado que no existen sitios de glicosilación potenciales enlazados a N en las regiones variables de CE7.

Distribuciones De Oligosacáridos Y Niveles De Complejo Biseccionado.

- 30 35 *Oligosacáridos De Diferentes Muestras De chCE7.* Se obtuvieron los perfiles de oligosacáridos por espectrometría de masas láser ionización/desorción asistida por matriz en un instrumento de tiempo de vuelo (MALDI/TOF/MS). Mixturas de oligosacáridos neutros enlazados a N derivados de cada una de las 4 muestras de anticuerpo producidas por CHO y de una muestra de chCE7 derivada del mieloma de ratón SP2/0 (CE7-SP2/0) se analizaron utilizando ácido 2,5-deshidrobenzoico (2,5-DHB) como la matriz (FIGURA 9). En estas condiciones, los oligosacáridos neutros aparecen esencialmente como iones $[N+Na^+]$ simples, que a veces van acompañados por iones $[N+K^+]$ más pequeños, dependiendo del contenido de potasio de la matriz. Bergweff *et al.*, 1995, Glycoconjugate J. 12: 318-330.
- 40 45 50 Este tipo de análisis produce a la vez las proporciones relativas de oligosacáridos neutros de masa diferente, reflejada por la altura de pico relativa, y la composición isobárica de monosacáridos de cada pico. Küster *et al.*, 1997, *arriba*; Naven y Harvey, 1996, Rapid Commun. Mass Spectrom. 10:1361-1366. Se asignan estructuras provisionales a los picos basadas en la composición de monosacáridos, el conocimiento del camino de biosíntesis, y en datos estructurales previos para oligosacáridos derivados de la misma glicoproteína producida por el mismo hospedador, dado que la cadena principal de la proteína y el tipo de célula pueden tener una influencia acusada en la distribución de oligosacáridos. Field *et al.*, 1996, Anal. Biochem. 239: 92-98. En el caso de los oligosacáridos asociados a Fc, únicamente se han detectado oligosacáridos complejos bi-antennarios en IgGs presentes en suero humano o producido por cultivos de células de mamífero en condiciones normales. Wormald *et al.*, 1997, Biochemistry 36: 1370-1380; Wright y Morrison, 1997, Tibtech 15: 26-31. El camino que conduce a estos compuestos se ilustra en FIGURA 10, que incluye la masa del ion $[M+Na^+]$ correspondiente a cada oligosacárido.

Se han detectado también oligosacáridos ricos en manosa en anticuerpos producidos en las fases estacionarias y de muerte de cultivos de células por lotes. Yu Ip *et al.*, 1994, Arch. Biochem. Biophys. 308: 387-399.

- 55 60 Los dos picos principales en la muestra CE7-SP2/0 (FIGURA 9A) corresponden a masas de oligosacáridos fucosilados con cuatro N-acetilhexosaminas (HexNAcs) que contienen tres (m/z 1486) o cuatro (m/z 1648) hexosas. Véase la FIGURA 10, pero obsérvese que la notación resumida para los oligosacáridos en esta figura no tienen en cuenta las dos GlcNAcs del centro. Esta composición es coherente con estructuras de oligosacáridos complejos fucosilados en el centro y bi-antennarios que llevan cero o un residuo galactosa, respectivamente, típicos de los oligosacáridos asociados a Fc, y como se ha observado previamente en el análisis NMR de oligosacáridos Fc derivados de una IgG1 química expresada en células SP2/0. Bergweff *et al.*, 1995, *arriba*.

La transferencia catalizada por GnT-III de una GlcNAc bisectante a estos compuestos bi-antenarios, que son los aceptores de GnT-III preferidos, conduciría a oligosacáridos con cinco HexNAcs (m/z 1689 y 1851, no- y mono-galactosilados, respectivamente, FIGURA 10), que están claramente ausentes en la muestra CE7-SP2/0. Los últimos picos aparecen cuando chCE7 se expresa en células CHO-tet-GnT-III^m. En los anticuerpos expresados en

5 CHO, los cuatro picos que contienen HexNAc están también fucosilados en su mayoría, aunque es evidente una pequeña cantidad de estructuras no fucosiladas a partir del pico en m/z 1339 (Véase la FIGURA 10). El nivel de galactosilación no es tampoco muy diferente entre el material derivado de CHO y SP2/0. Al nivel basal de expresión de GnT-III (muestra CE7-2000t, FIGURA 9B), las moléculas con cinco HexNAcs están presentes en menor proporción que aquéllas que contienen cuatro HexNAcs. Un nivel mayor de expresión de GnT-III (muestra CE7-60t, FIGURA 9C) conducía a una inversión de las proporciones a favor de oligosacáridos con cinco HexNAcs.

10 Basándose en esta tendencia, pueden asignarse estructuras complejas de oligosacáridos biseccionados bi-antenarios a compuestos con cinco HexNAcs en estas muestras. Oligosacáridos tri-antenarios enlazados a N, los isómeros alternativos que contienen cinco HexNAc, no se han encontrado nunca en la región Fc de IgGs, y sus 15 síntesis son catalizadas por GlcNAc-transferasas discretas de GnT-III.

20 Un aumento ulterior en la expresión de GnT-III (muestra CE7-30t, FIGURA 9D) no conducía a ningún cambio importante en los niveles de oligosacáridos complejos biseccionados. Otro pico (m/z 1543) que contiene cinco HexNAcs aparece a niveles bajos, pero relativamente constante en las muestras CHO-GnT-III y corresponde en masa a una masa de oligosacárido no-fucosilada, compleja y biseccionada (FIGURA 10). Los picos menores a m/z 1705 y 1867, corresponden también a oligosacáridos complejos bi-antenarios que contienen cinco HexNAc. Los mismos pueden asignarse a aductos de potasio de los picos a m/z 1689 y 1851 (diferencia de masas de 16 Da con respecto a aductos de sodio) (Küster *et al.*, 1997 arriba) o a oligosacáridos complejos biseccionados mono- y bi-galactosilados sin fucosa (FIGURA 10). En conjunto, los oligosacáridos complejos biseccionados ascienden a 25 aproximadamente 25% del total en la muestra CE7-2000t y alcanzan aproximadamente 45 a 50% en las muestras CE7-60t y CE7-30t.

Información Adicional A Partir De Los Perfiles De Oligosacáridos De Chce7

30 **Muestras.** Aunque los niveles de oligosacáridos complejos biseccionados no eran tan altos en la muestra CE730t, la sobreexpresión incrementada de GnT-III continuaba reduciendo, si bien en menor grado, las proporciones de sustratos de oligosacáridos complejos bi-antenarios. Esto iba acompañado de aumentos moderados en dos picos diferentes que contenían cuatro HexNAc (m/z 1664 y 1810). Los dos últimos picos pueden corresponder a oligosacáridos complejos bi-antenarios galactosilados o a compuestos híbridos biseccionados (FIGURA 11). Es 35 posible también una combinación de ambas clases de estructuras. El aumento relativo en estos picos es coherente con la acumulación de sub-productos híbridos biseccionados de sobreexpresión de GnT-III. De hecho, la muestra producida al nivel máximo de sobreexpresión de GnT-III, CE7-15t, exhibía un gran aumento en el pico a m/z 1664, una reducción en el pico a m/z 1810 y una reducción concomitante de oligosacáridos complejos biseccionados a un nivel de aproximadamente 25%. Véanse los picos con m/z 1689 y 1851 en FIGURA 9E y las estructuras 40 correspondientes en FIGURA 11. La mayor acumulación de sub-productos híbridos biseccionados no fucosilados (m/z 1664), en lugar de subproductos fucosilados (m/z 1810), estaría de acuerdo con el hecho de que los oligosacáridos que son modificados primeramente por GnT-III ya no pueden ser sustratos biosintéticos para la α-1,6-fucosiltransferasa central. Schachter, 1986, Biochem. Cell Biol. 64: 163-181.

45 El pico a m/z 1257 está presente a un nivel de 10-15% del total en las muestras derivadas de CHO y a un nivel inferior en CE7-SP2/0 (FIGURA 9). El mismo corresponde a cinco hexosas más dos HexNAcs. La única estructura de oligosacárido enlazada a N conocida con esta composición es un compuesto del tipo rico en manosa que contiene cinco manosas. Otro oligosacárido rico en manosa, uno con seis manosas (m/z 1420), está presente también a niveles mucho menores. Como se ha mencionado arriba, tales oligosacáridos han sido detectados en el 50 Fc de IgGs expresadas en la fase tardía de cultivos de células por lotes. Yu Ip *et al.*, 1994 arriba.

55 **Citotoxicidad Celular Dependiente De Anticuerpos De Las Muestras De Chce7.** ChCE7 exhibe cierta actividad de ADCC, medida como lisis *in vitro* de las células de neuroblastoma por los linfocitos humanos, cuando se expresan en células CHO-tet-GnT-III^m con el nivel mínimo de sobreexpresión de GnT-III (FIGURA 12, muestra CE7-2000t). El aumento del nivel de GnT-III producía un gran incremento en la actividad de ADCC (FIGURA 12, muestra CE7-60t). La sobreexpresión adicional de GnT-III no iba acompañada por un aumento adicional de actividad (FIGURA 12, muestra CE7-30t), y el nivel de expresión máximo conducía realmente a ADCC reducida (FIGURA 12, muestra CE7-15t). Además de exhibir las actividades máximas de ADCC, ambas muestras CE7-60t y CE7-30t exhiben niveles significativos de citotoxicidad a concentraciones muy bajas de anticuerpo. Estos resultados demuestran que existe 60 un rango óptimo de sobreexpresión de GnT-III en las células CHO para actividad de ADCC, y la comparación con los

perfíles de oligosacáridos demuestra que la actividad está correlacionada con el nivel de oligosacáridos complejos biseccionados asociados a Fc.

Dada la importancia de los oligosacáridos complejos biseccionados para la actividad de ADCC, podría ser útil modificar por ingeniería el camino para aumentar adicionalmente la proporción de estos compuestos. La sobreexpresión de GnT-III a niveles que se aproximan al utilizado para la muestra CE730t está dentro del rango biotecnológicamente práctico en el que no se observan toxicidad e inhibición del crecimiento significativas. A este nivel de expresión, los oligosacáridos complejos bi-antenarios no galactosilados y no biseccionados, es decir, los sustratos potenciales de GnT-III preferidos, se reducen a menos de 10% del total. Véase el pico m/z 1486, FIGURA 9D. Sin embargo, sólo el 50% se convierten en las estructuras complejas biantenarias biseccionadas deseadas. El resto, o bien se desvían a subproductos oligosacáridos híbridos biseccionados o son consumidos por la enzima competitora β 1,4-galactosiltransferasa, GalT (FIGURA 11).

La resolución de los picos de oligosacáridos complejos híbridos biseccionados y los no biseccionados galactosilados por análisis estructurales complementarios podría determinar cuánto consume cada ruta potencial no deseada. El crecimiento de los picos m/z 1664 y 1810 a niveles de sobreexpresión de GnT-III elevados sugiere que al menos una fracción de estos picos corresponde a oligosacáridos híbridos biseccionados (FIGURA 11). En teoría, un flujo que pasa a compuestos híbridos biseccionados puede reducirse por co-sobreexpresión de enzimas anteriores en el camino tales como mannosidasa II junto con GnT-III. Por otra parte, la competición entre GnT-III y GalT para sustratos de oligosacáridos complejos biseccionados podría polarizarse potencialmente hacia reacciones catalizadas por GnT-III, por aumento de la concentración intra-Golgi de UDP-GlcNAc mientras que se sobreexpresa GnT-III. GnT-III transfiere una GlcNAc del co-sustrato UDP-GlcNAc a los diferentes oligosacáridos. En caso de que la concentración intra-Golgi del co-sustrato UDP-GlcNAc sea sub-saturante para GnT-III, entonces el aumento de la misma, sea por manipulación de la composición del medio de cultivo o por manipulación genética del transporte de azúcar-nucleótidos al Golgi, podría favorecer GnT-III en una competición para oligosacáridos con GalT.

Queda por determinar si el aumento en la actividad de ADCC es resultado del aumento en ambos oligosacáridos complejos biseccionados galactosilados y no galactosilados, o sólo de una de estas formas. Véanse los picos a m/z 1689 y 1851 en la FIGURA 9. Si se encuentra que los oligosacáridos bi-antenarios complejos biseccionados y galactosilados son las estructuras óptimas para la actividad incrementada de ADCC, entonces la maximización de la fracción de estos compuestos en la región Fc requeriría la sobreexpresión tanto de GnT-III como de GalT. Dado el escenario competitivo expuesto previamente, los niveles de expresión de ambos genes tendrían que estar regulados cuidadosamente. Además, sería valioso intentar redistribuir GalT sobreexpresado tanto como fuera posible hacia la TGN en lugar de la cisterna trans-Golgi. La última estrategia puede realizarse por intercambio de las secuencias que codifican la región transmembranal de GalT con las de α -2,6-sialiltransferasa (Chege y Pfeffer, 1990, J. Cell Biol. 111: 893-899).

D. Ejemplo 4: Ingeniería De La Glicosilación Del Anticuerpo Monoclonal C2b8 Anti-CD20

C2B8 es un anticuerpo químérico anti-humano CD20, Reff, M.E. et al., 1994, arriba. El mismo recibió la aprobación de la FDA en 1997 y está siendo utilizado actualmente, bajo el nombre comercial RituXan™, para el tratamiento del linfoma No-Hodgkin en los Estados Unidos. El mismo se deriva de un cultivo de células CHO y por consiguiente no debería llevar oligosacáridos biseccionados. Véase arriba. Con objeto de producir una versión mejorada de este anticuerpo, se aplicó el método demostrado previamente para el anticuerpo anti-neuroblastoma chC7. Véase arriba. El anticuerpo C2B8 modificado de acuerdo con el método descrito tenía una actividad de ADCC mayor que el anticuerpo C2B8 estándar no modificado producido en condiciones idénticas de cultivo de células y purificación.

1. Material Y Métodos

Síntesis De Las Regiones De Cadena Ligera Variable Y Pesada Variable Del Anticuerpo Monoclonal Químérico Anti-CD20 (C2B8). Los genes VH y VL del anticuerpo C2B8 se ensamblaron sintéticamente utilizando una serie de oligonucleótidos monocatenarios solapantes (cebadores) en un proceso de un solo paso utilizando PCR, Kobayashi et al, 1997, Biotechniques 23: 500-503. Los datos de la secuencia codificante para las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (VL y VH respectivamente) del anticuerpo anti-CD20 se obtuvieron de una solicitud de patente internacional publicada (Número de Publicación Internacional: WO 94/11026). Los fragmentos de DNA ensamblados se subclonaron en pBluescriptIIKS(+) y se secuenciaron por secuenciación cíclica de DNA para comprobar que no se había introducido mutación alguna.

Construcción De Vectores Para Expresión Del Anticuerpo Monoclonal Químérico Anti-CD20 (C2B8). Las regiones codificantes VH y VL del anticuerpo monoclonal C2B8 se subclonaron en pchCE7H y pchCE7L, respectivamente. En la subclonación, las secuencias codificantes para las cadenas variables pesada y ligera del anti-neuroblastoma CE7

(Véase arriba) se intercambiaron con las regiones de las cadenas pesada variable y ligera variable ensambladas sintéticamente de C2B8.

Generación De Células CHO-tet-GnT-III_m Que Expresaban El Anticuerpo C2B8. El método para la generación de una línea de células CHO-tet-GnT_{III}_m era exactamente el mismo que para CHO-tet-GnT_{III}_m-CE7. Véase arriba. El clon seleccionado para trabajo ulterior se designó CHO-tet-GnT-III_m-C2B8.

Generación De CHO-tTA Que Expresa El Anticuerpo C2B8. CHO-tTA es la línea de células parental de CHO-tet-GnT-III_m. Véase arriba. El método para la generación de una línea de células CHO-tTA que expresaba el anticuerpo C2B8 sin expresión de GnT-III era exactamente el mismo que para CHO-tet-GnT-III_m-C2B8 y CHO-tet-GnT-III_m chCE7. Véase arriba. El clon seleccionado para el trabajo ulterior se designó CHO-tTA-C2B8.

Producción De Muestras De Anticuerpo C2B8. Se derivaron dos muestras de anticuerpo C2B8 de cultivos paralelos de CHO-tet-GnT-III_m-C2B8, conteniendo cada cultivo niveles diferentes de tetraciclina, por lo que se esperaba que expresaran GnT-III a niveles diferentes. Los niveles de tetraciclina eran 2000, 50, y 25 ng/ml. Las muestras de anticuerpo C2B8 derivadas de estos cultivos se designaron como C2B8-2000t, C2B8-50t, y C2B8-25t, respectivamente. En paralelo, una muestra de anticuerpo (C2B8-nt) se preparó a partir de un cultivo de CHO-tTA-C2B8, no expresando esta línea de células GnT-III. Se cultivaron células CH-TTA-C2B8 sin tetraciclina.

Análisis De La Expresión De GnT-III. Para análisis de GnT-III por transferencia western, se resolvieron lisados de células de cada uno de los cultivos de producción por SDS-PAGE y se sometieron a electrotransferencia a membranas de poli(difluoruro de vinilideno). Se utilizaron anticuerpo monoclonal 9E10 anti-cmyc y peroxidasa de rábano picante anti-IgG de ratón (Amersham, Arlington, IL) como anticuerpos primario y secundario respectivamente. El anticuerpo fijado se detectó utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado (Amersham, Arlington, IL).

Purificación De Las Muestras De Anticuerpo C2B8. Las muestras de anticuerpo se purificaron utilizando el mismo procedimiento que para las muestras de anticuerpo chCE7. Véase arriba. La concentración se midió utilizando un kit de Molecular Probes basado en fluorescencia (Leiden, Países Bajos).

Verificación De La Fijación Del Antígeno Específico C2B8. La especificidad de fijación de antígeno del anticuerpo monoclonal C2B8 anti-CD20 se verificó utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con células en suspensión. Para este estudio, se utilizaron células CD20 positivas (células SB; depósito ATCC No. ATCC CCL120) y células negativas CD20 (células HSB; depósito ATCC No. ATCC CCL 120.1). Las células de cada tipo se incubaron con anticuerpo C2B8 producido a 25 ng/ml de tetraciclina, como anticuerpo primario. Los controles negativos incluían HBSB en lugar de anticuerpo primario. Se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana específico de Fc, policlonal y conjugado a FITC para todas las muestras como anticuerpo secundario (SIGMA, St. Louis, MO). Los cultivos se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica (Bensheim, Alemania).

Ensayo De Actividad ADCC. La lisis de las células SB (células diana CD20+; depósito ACC No. ATCC CCL120) por células mononucleares de sangre periférica humana empobrecida en monocitos (células efectoras) en presencia de concentraciones diferentes de muestras C2B8 se realizó siguiendo básicamente el mismo procedimiento descrito en Blunner et al., 1968, Immunology 14: 181-189. La ratio de células efectoras a células diana era 100:1.

45 2. Resultados y Discusión

GnT-III Se Expresa A Niveles Diferentes En Diferentes Líneas Y Cultivos De Células. Las células de los cultivos paralelos CHO-tet-GnT-III_m-C2B8, cada uno de los cuales contenía niveles diferentes de tetraciclina (2000, 50, y 25 ng/ml), por lo que se esperaba que expresaran GnT-III a niveles diferentes se lisaron, y los lisados de células se resolvieron por SDS-PAGE y se detectaron por transferencia western. Los lisados del cultivo que se dejó crecer a 25 ng/ml de tetraciclina exhibían una banda intensa para el peso molecular correspondiente de GnT-III, mientras que los cultivos que se dejaron crecer a 50 y a 2000 ng/ml exhibían una expresión mucho menor de GnT-III, como se muestra en la FIGURA 13.

Verificación De La Fijación Específica Del Antígeno C2B8. Las muestras de C2B8 producidas a partir de cultivos paralelos de células que expresaban niveles diferentes de GnT-III se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad y se cambiaron de tampón a PBS en una columna de intercambio de catión. Se estimó que la pureza era mayor que 95% por tinción con Azul Coomassie de una SDS-PAGE en condiciones reductoras. Estas muestras de anticuerpo se derivaban de la expresión de genes de anticuerpos cuyas regiones variables se sintetizaron por un método de ensamblaje PCR. La secuenciación de los fragmentos sintéticos de cDNA no reveló diferencia alguna respecto a las secuencias de región variable de C2B8 originales publicadas previamente

en una solicitud de patente Internacional (Número de Publicación Internacional WO 94/11026). Se demostró por inmunofluorescencia indirecta la fijación específica de las muestras a CD20 humano, el antígeno diana de C2B8, utilizando una línea de células linfoblastoides humanas SB que expresaban CD20 en su superficie y una línea de células linfoblastoides HSB que carecía de este antígeno. La muestra de anticuerpo C2B8-25t daba tinción positiva

5 de las células SB (FIGURA 14A), pero no de las células HSB en condiciones experimentales idénticas (véase la FIGURA 14B). Un control negativo adicional constituido por células SB incubadas con tampón PBS en lugar del anticuerpo C2B8-25t. El mismo no exhibía tinción en absoluto.

10 Actividad ADCC In Vitro De Las Muestras C2B8. La muestra de anticuerpo C2B8-nt expresada en células CHO-tTA-C2B8 que no expresan GnT-III (véase arriba) exhibía 31% de actividad citotóxica (a 1 µg/ml de concentración de anticuerpos), medida como lisis *in vitro* de las células SB (CD20+) por los linfocitos humanos (FIGURA 15, muestra C2B8-nt). El anticuerpo C2B8-2000t derivado de un cultivo CHO-tet-GnT-III dejado crecer a 2000 ng/ml de tetraciclina (es decir, al nivel basal de expresión de GnT-III clonado) exhibía a 1 µg/ml de concentración de anticuerpo un aumento de 33% en actividad de ADCC con respecto a la muestra C2B8-nt a la misma concentración de anticuerpo. La reducción de la concentración de tetraciclina a 25 ng/ml (muestra C2B8-25t), que aumentaba significativamente la expresión incrementada de GnT-III, producía un gran aumento de casi 80% en la actividad máxima de ADCC (a 1 µg/ml de concentración de anticuerpo) con respecto a la muestra de anticuerpo C2B8-nt a la misma concentración de anticuerpo (FIGURA 15, muestra C2B8-25t).

15 20 Además de exhibir la actividad máxima de ADCC, C2B8-25t exhibía niveles significativos de citotoxicidad a concentraciones muy bajas de anticuerpo. La muestra de C2B8-25t a 0,06 µg/ml exhibía una actividad de ADCC similar a la actividad de ADCC máxima de C2B8-nt a 1 µg/ml. Este resultado demostraba que la muestra C2B8-25t, para una concentración de anticuerpo 16 veces menor, alcanzaba la misma actividad de ADCC que C2B8-nt. Este resultado indica que el anticuerpo químérico C2B8 anti-CD20 producido en una línea de células que expresaba activamente GnT-III era significativamente más activo que el mismo anticuerpo producido de una línea de células que no expresaba GnT-III.

25 Una ventaja de este anticuerpo utilizando los métodos de la invención es que (1) tienen que inyectarse dosis menores de anticuerpo para alcanzar el mismo efecto terapéutico, lo que tiene un impacto beneficioso en la economía de producción de anticuerpos, o (2) que utilizando la misma dosis de anticuerpo se obtiene un efecto terapéutico mejor.

E. Ejemplo 5: Establecimiento De Líneas De Células CHO Con Expresión Constitutiva De Genes De Glicosiltransferasa A Niveles Óptimos Que Conducen A Actividad Máxima De ADCC

30 35 En algunas aplicaciones del método para mejora de la ADCC puede ser deseable utilizar expresión constitutiva en lugar de expresión regulada de GnT-III en sí misma o junto con otras glicosiltransferasas y/o glicosidasas clonadas. Sin embargo, los inventores han demostrado que la actividad de ADCC del anticuerpo modificado depende del nivel de expresión de GnT-III. Véase arriba. Por tanto, es importante seleccionar un clon con expresión constitutiva de GnT-III solo o junto con otros genes de glicosiltransferasa y/o glicosidasa a niveles óptimos o próximos a los óptimos. Los niveles óptimos de expresión de GnT-III, sea solo o junto con otras glicosil-transferasas tales como β(1,4)-galactosil-transferasa (GalT), se determinan primeramente utilizando líneas de células con expresión regulada de las glicosil-transferasas. Los clones estables con expresión constitutiva de GnT-III y cualquier otra glicosiltransferasa clonada se someten luego a cribado respecto a niveles de expresión próximos al óptimo.

1. Determinación De Los Niveles De Expresión Próximos Al Óptimo

40 Construcción De Un Vector Para Expresión Regulada De GnT-III Ligada A La Expresión De GFP. Cada gen de glicosil-transferasa está unido, por la vía de una secuencia IRES, a un gen informador que codifica una proteína retenida en la célula, v.g., la proteína verde fluorescente (GFP) o una proteína de la membrana plasmática marcada con un péptido que puede ser reconocido por anticuerpos disponibles. Si se está testando más de una glicosil-transferasa, se asocia un marcador diferente con cada glicosil-transferasa, v.g., GnT-III puede asociarse a GFP y GalT puede asociarse a la proteína fluorescente azul (BFP). Una casete de expresión eucariota constituida por el cDNA de GnT-III aguas arriba de un elemento IRES aguas arriba del cDNA de GFP se ensambla primeramente por pasos estándar de subclonación y/o PCR. Esta casete se subclona luego en el vector de expresión regulada de tetraciclina pUHD10-3 (véase arriba), aguas abajo del promotor tet y aguas arriba de las secuencias de terminación y poliadenilación dando como resultado el vector pUHD10-3-GnT-III-GFP.

45 50 55 60 Establecimiento De Células CHO Con Expresión Regulada De GnT-III Unida A Expresión De GFP Y Expresión Constitutiva Del Anticuerpo Chce7. Células CHO-tTA (véase arriba) que expresan el transactivador sensible a

tetraciclina, se co-transfектan con el vector pUHD10-3GnT-III-GFP y el vector pPUR para expresión de un gen de resistencia a puromicina. Véase arriba. Se seleccionan clones resistentes a puromicina en presencia de tetraciclina.

Los clones individuales se cultivan por duplicado en presencia (2 µg/ml) o ausencia de tetraciclina. Seis clones que exhiben inhibición del crecimiento en ausencia de tetraciclina, debido a la sobreexpresión de glicosil-transferasa (véase arriba), se seleccionan y se analizan respecto a clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) respecto a la detección de la señal asociada a GFP. Un clon que da la ratio de inducción más alta, definida como la ratio de fluorescencia en ausencia de tetraciclina a fluorescencia en presencia de tetraciclina se selecciona para trabajo ulterior y se designa como CHO-tet-GnT-III-GFP. Los CHO-tet-GnT-III-GFP se transfecitan con vectores de expresión para el anticuerpo chCE7 y se selecciona un clon con expresión constitutiva alta de este anticuerpo, CHO-tet-GnT-III-GFP-chCE7. Véase arriba.

Producción De Muestras De Chce7, Medida De La Actividad De ADCC Y Determinación De Los Niveles De Expresión Óptimos De GnT-III. Cultivos paralelos de CHO-tet-GnT-III-GFP-chCE7 se dejan crecer a niveles diferentes de tetraciclina, y que expresan por tanto GnT-III junto con GFP a niveles diferentes. Las muestras de anticuerpo chCE7 se purifican a partir de los sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad. En paralelo, las células de cada cultivo se analizan por FACS para determinar el nivel medio de fluorescencia asociada a GFP, que está correlacionado con el nivel de expresión de GnT-III, de cada cultivo. Se determina la actividad de ADCC *in vitro* de cada muestra de anticuerpo chCE7 (véase arriba) y la actividad de ADCC máxima *in vitro* de cada muestra se representa gráficamente contra la fluorescencia media de las células utilizadas para producirla.

2. Establecimiento De Una Línea De Células CHO Con Expresión Constitutiva De GnT-III A Niveles Próximos Al Óptimo

La casete GnT-III-IRES-GFP (véase arriba) se subclona en un vector de expresión constitutiva. Células CHO se co-transfécian de manera estable con este vector y un vector para resistencia a puromicina. Las células resistentes a puromicina se seleccionan. Esta población de células transfecitadas de manera estable se clasifica luego por FACS, y se seleccionan los clones que expresan los niveles del gen informador GFP próximos a estar dentro del rango en el que se alcanza la actividad de ADCC óptima o próxima a la óptima. Véase arriba. Este paso final de transfección puede realizarse o bien sobre células CHO que expresan ya de manera estable un anticuerpo terapéutico o sobre células CHO vacías, v.g., células DUKX o DG44 dhfr-CHO. En el último caso, los clones obtenidos por el procedimiento arriba descrito se transfeciarán con vectores de expresión de anticuerpos terapéuticos a fin de generar las líneas de células productoras de anticuerpos finales.

F. Ejemplo 6: Expresión En La Superficie Celular De Una Quimera Fc De IgG Humana Con Glicosilación Optimizada

La terapia de células encapsuladas está siendo testada actualmente para varias enfermedades. Un implante de células encapsuladas se diseña de modo que se sitúe quirúrgicamente en el cuerpo para suministrar una sustancia terapéutica deseada directamente donde se necesita. No obstante, si una vez implantado el dispositivo encapsulado sufre un fallo mecánico, las células pueden escapar y hacerse indeseables. Una vía para destruir las células indeseables escapadas en el cuerpo es por un mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. Para este propósito, las células a encapsular pueden modificarse previamente por ingeniería para expresar una proteína de fusión anclada a la membrana plasmática constituida por un dominio transmembranal de tipo II que se localiza en la membrana plasmática fusionada al término N de una región Fc. Stabila, P.F., 1998, *supra*. Las células en el interior de la cápsula están protegidas contra la citotoxicidad celular mediada por Fc por la cápsula, mientras que las células escapadas son accesibles para la destrucción por los linfocitos que reconocen las regiones Fc que se presentan en la superficie, es decir, por un mecanismo de citotoxicidad celular medida por Fc. Este ejemplo ilustra de qué modo se mejora esta actividad de citotoxicidad celular mediada por Fc por ingeniería de glicosilación de las regiones Fc presentadas.

1. Establecimiento De Células Que Expresan La Quimera Fc En Su Superficie Y Que Expresan GnT-III

Las células a implantar para una terapia particular, por ejemplo células de riñón de cría de hámster (BHK), que producen ya la quimera Fc presentada en la superficie y una proteína terapéutica secretada, se transfecitan inicialmente de manera estable con un vector para expresión constitutiva de GnT-III enlazado por la vía de un elemento IRES para expresión de GFP. Véase arriba. Los transfecitantes estables se seleccionan por medio de un marcador incorporado en el vector, v.g., por medio de un marcador de resistencia al fármaco y se seleccionan para supervivencia en presencia del fármaco.

2. Cribado De Células Que Expresan Niveles Diferentes De GnT-III Y Medida

Los transfectantes estables se analizan por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) y se seleccionan una serie de clones con niveles de fluorescencia medios para estudios ulteriores. Cada clon seleccionado se deja crecer y se reanaliza por FACS para asegurar la estabilidad de GFP, y por tanto la expresión asociada de GnT-III.

3. Verificación De Niveles Diferentes De Oligosacáridos Complejos Biseccionados En Las Regiones Fc Presentadas

- 10 Las regiones Fc de tres clones con niveles diferentes de fluorescencia asociada a GFP y de las células BHK originales no transfectadas con el vector GnT-III-IRES-GFP se solubilizan a partir de la membrana por medio de un detergente y se purifican luego por cromatografía de afinidad. Se separan luego los oligosacáridos, se purifican y se analizan por MALDI-TOF/MS. Véase arriba. Los perfiles resultantes de MALDI-TOF/MS muestran que las regiones Fc de los clones fluorescentes modificados llevan proporciones diferentes de oligosacáridos complejos biseccionados. El perfil MALDI de las células no modificadas no exhibe pico alguno asociado a oligosacáridos biseccionados. El clon que es portador de los niveles máximos de oligosacáridos complejos biseccionados en las regiones Fc presentadas se selecciona para trabajo ulterior.

4. Ensayo De Actividad De Citotoxicidad Celular Mediada Por Fc *In Vitro*

- 20 Se conducen luego en paralelo dos ensayos de actividad de citotoxicidad celular mediada por Fc. En un ensayo, las células diana se derivan del clon seleccionado anteriormente. En el ensayo paralelo, las células diana son las células originales a encapsular y que no han sido modificadas para expresar GnT-III. El ensayo se conduce utilizando el procedimiento descrito previamente (véase arriba) pero en ausencia de cualquier anticuerpo adicional, dado que las células diana presentan ya regiones Fc. Este experimento demuestra que la actividad de citotoxicidad celular mediada por Fc contra las células que expresan GnT-III es mayor que contra las células que no expresan esta glicosiltransferasa.

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora de mamífero que expresa un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc de IgG que contiene oligosacáridos enlazados a N, en donde dicha célula hospedadora ha sido modificada genéticamente para regular la expresión incrementada de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, en donde dicho anticuerpo recombinante tiene una proporción incrementada de residuos GlcNAc en la región Fc con relación a la proporción de residuos fucosa y tiene una citotoxicidad celular incrementada mediada por Fc, comparado con el anticuerpo correspondiente producido por la misma célula hospedadora que no ha sido modificada genéticamente.
2. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicha modificación genética comprende introducir en dicha célula hospedadora al menos un polinucleótido que codifica $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.
3. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicha célula hospedadora se selecciona del grupo constituido por una célula CHO modificada por ingeniería de glicosilación, una célula BHK modificada por ingeniería de glicosilación, una célula NSO modificada por ingeniería de glicosilación, y una célula SP 2/0 modificada por ingeniería de glicosilación.
4. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo recombinante es un anticuerpo quimérico.
5. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo recombinante se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo entero, un fragmento de anticuerpo de la región Fc y una proteína de fusión que incluye una región Fc de una inmunoglobulina.
6. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo recombinante es un anticuerpo terapéutico.
7. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo recombinante es un anticuerpo monoclonal.
8. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde dicha $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es GnT-III de rata.

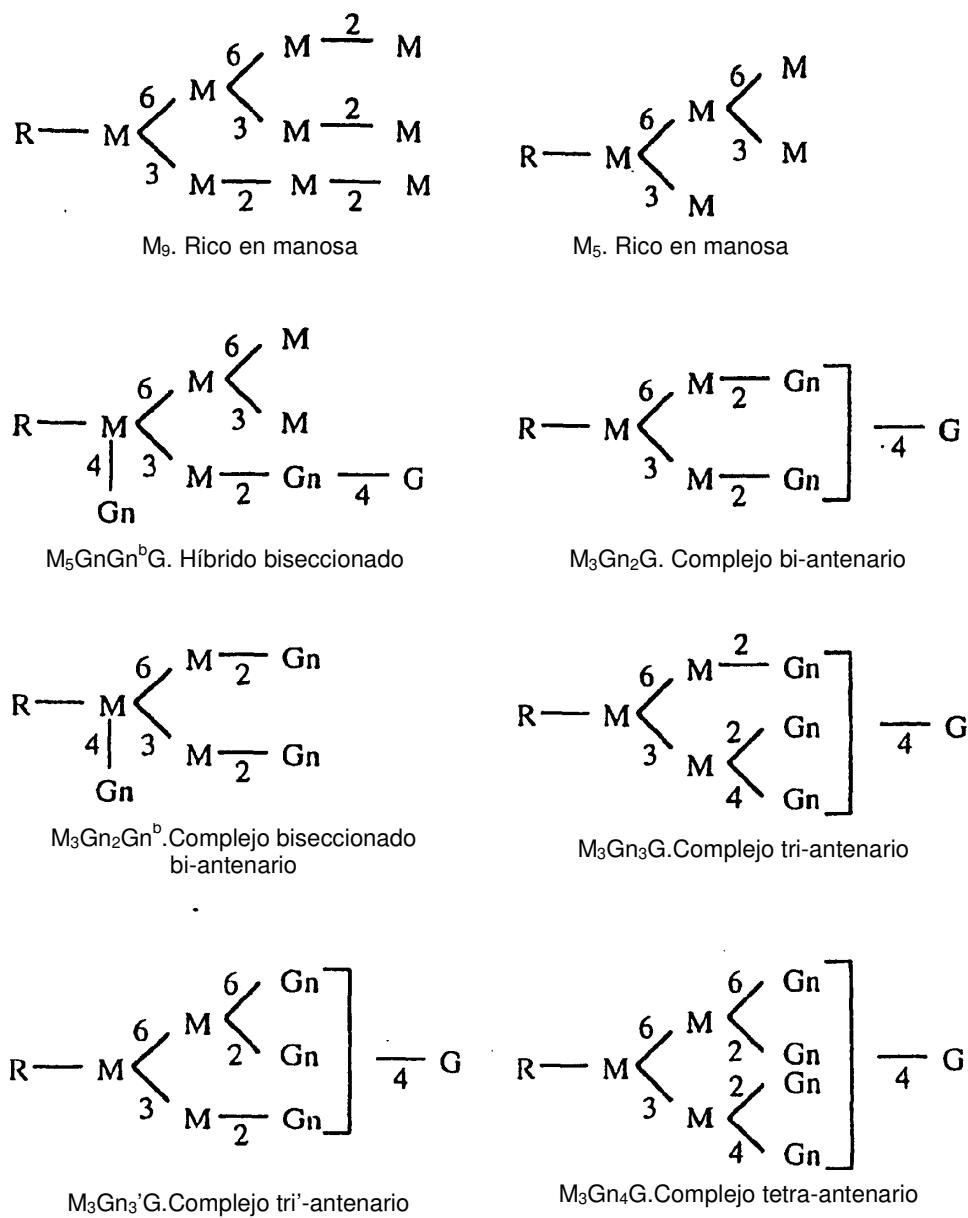


FIG.1

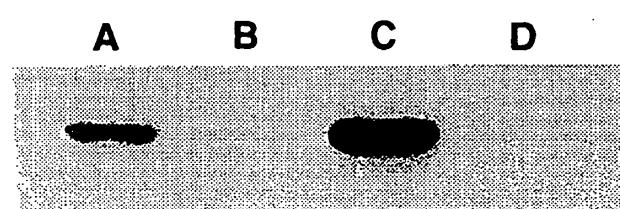


FIG.2

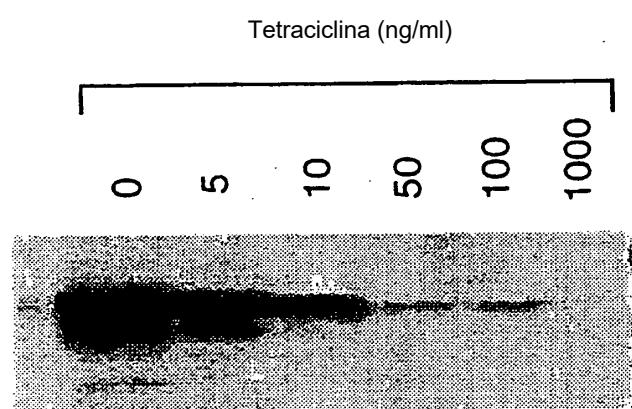


FIG.3

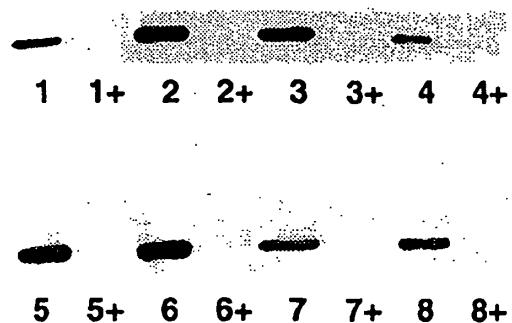


FIG.4A

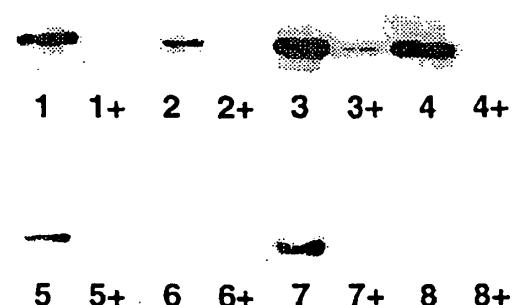


FIG.4B

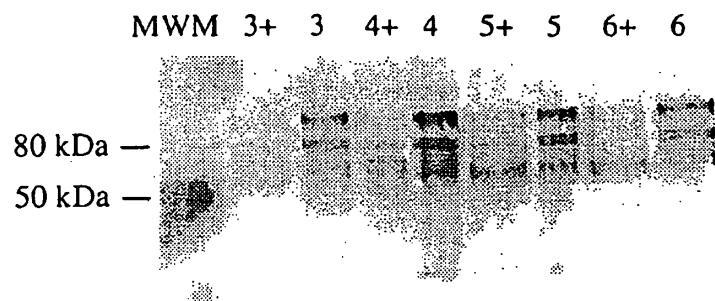


FIG.5A

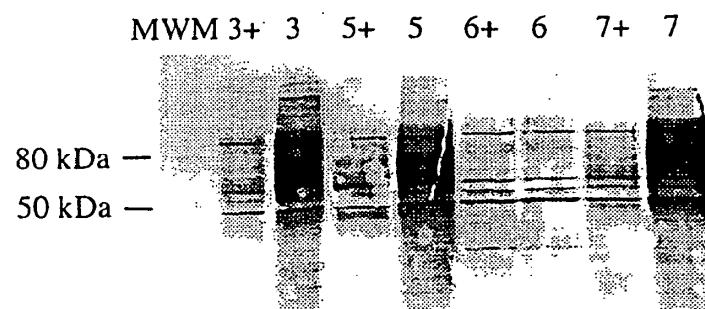


FIG.5B



FIG.6A

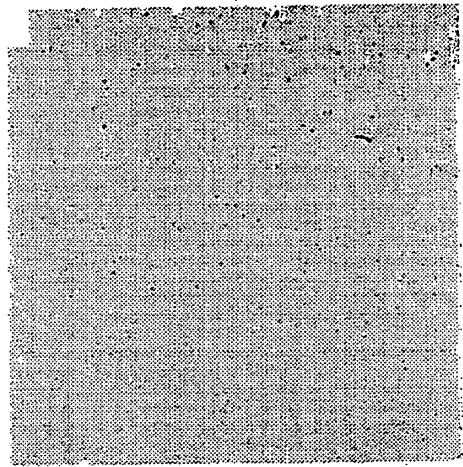


FIG.6B

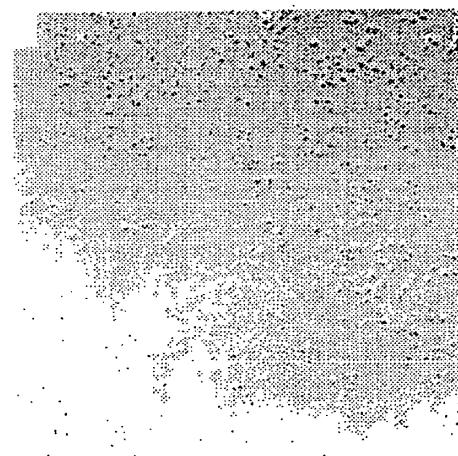


FIG.6C

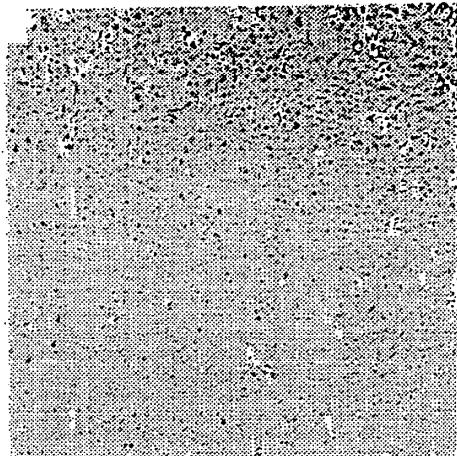


FIG.6D

solapamiento - CE7VHPCR.fwd

CE7VHPCR1.fwd 5' ttccctgtcgctgtgcacgcgtgtcctgtcccaggccaaactgcagca
conductor sintético 3'
CE7 VH 5'

CE7VHPCR2.fwd 5' gtgtgttaaacttccaccatgggtggagacctatctgtcttc
tgtcgctgttgctacg
Kozac Hind III solapamiento - CE7VHPCR.fwd
conductor sintético 5'

CE7VHPCR(1+2).rev 5' gtgtgtgaattcgcttagtggaggactgtgagagtgg
EcoRI NheI CE7 VH 3'

Exón 5' CH1

hGamma1CH1.fwd 5' gtttgttaaacttgc
Hind III NheI

solapamiento - CH2.fwd

hGamma1CH1.rev 5' ggcatgtgtgagtttgtcacaagaattggctcaacttctgtccac
Exón bisagra 5' Exón 3' CH1

solapamiento - CH1.rev

hGamma1CH2.fwd 5' tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcc
Exón bisagra 3' Exón 5' CH2

EXÓN 5' CH3 exón 3' CH2

hGamma1CH2.rev 5' cctgtggttctcggggtgc
solapamiento - CH3.fwd

solapamiento - CH2.rev

hGamma1CH3.fwd 5' gggcagccccgagaaccacagg
EXÓN 5' CH3

parada

hGamma1CH2.rev 5' gtgtgtggatccttacccggagacaggagag
BamHI EXÓN 3' CH3

FIG.7

solapamiento - CE7VLPCR2.fwd
 CE7VLPCR1.fwd 5' tgggtactgctgtctgggtccagggttccactggtgacatccagatgacacaatc
 conductor sintético 3' CE7 VL 5'
 Kozac
 CE7VLPCR2.fwd 5' gtgtgtaagcttcaccatggagacagacacactcctgtatgggtactgctgtctgggttc
Hind III conductor sintético 5'
 CE7VLPCR(1+2).rev 5' gtgtgtaatccgtacgttttttccaaactgtc
EcoRI BsiWI CE7 VL 3'
 VL murina h Kappa 5'
 hKappa.fwd 5' gtgtgtaagctcgtaacggtgctgcaccatc
Hind III BsiWI
 parada
 hKappa.rev 5' gtgtgtggatccctaaacacttccccgttgaa
BamHI hKappa 3'

FIG.8

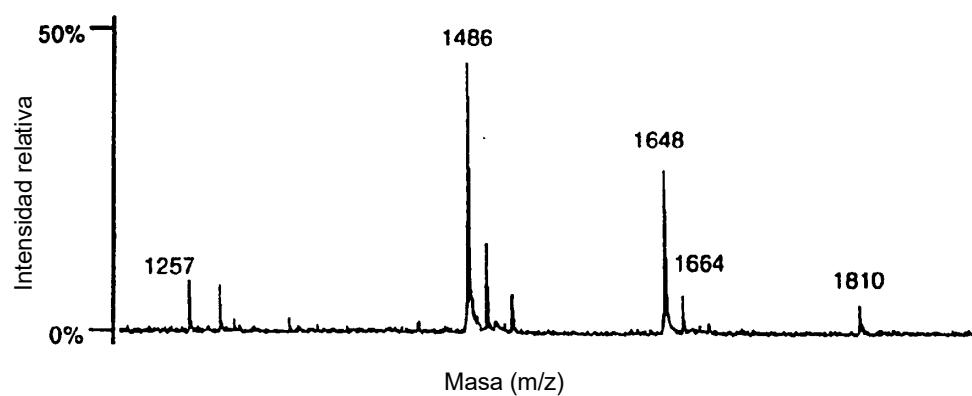


FIG.9A

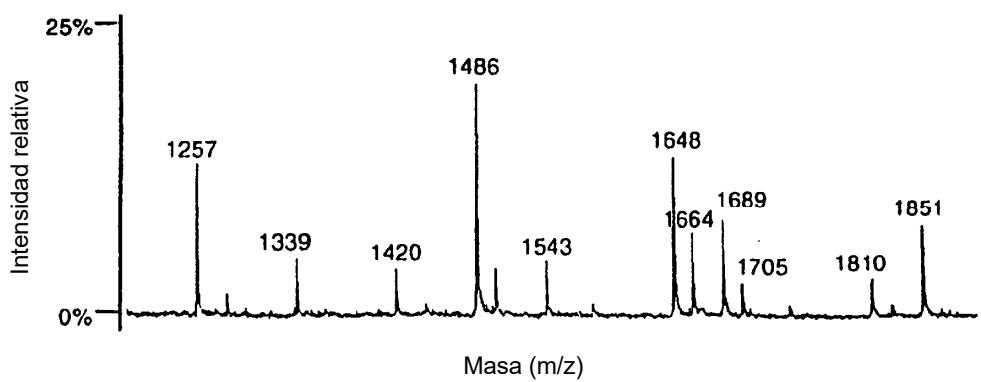


FIG.9B

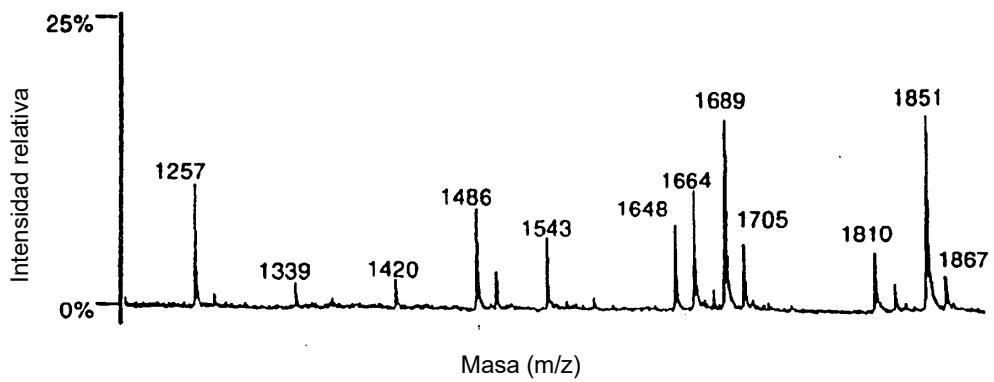


FIG.9C

ES 2 434 961 T5

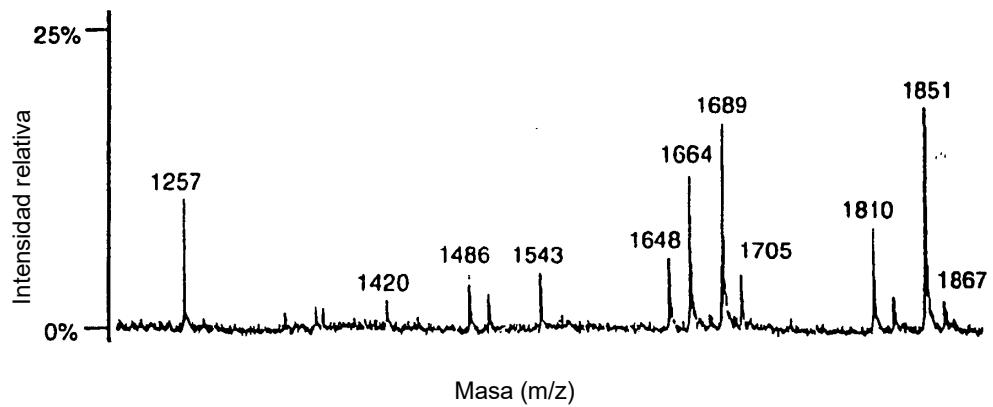


FIG.9D

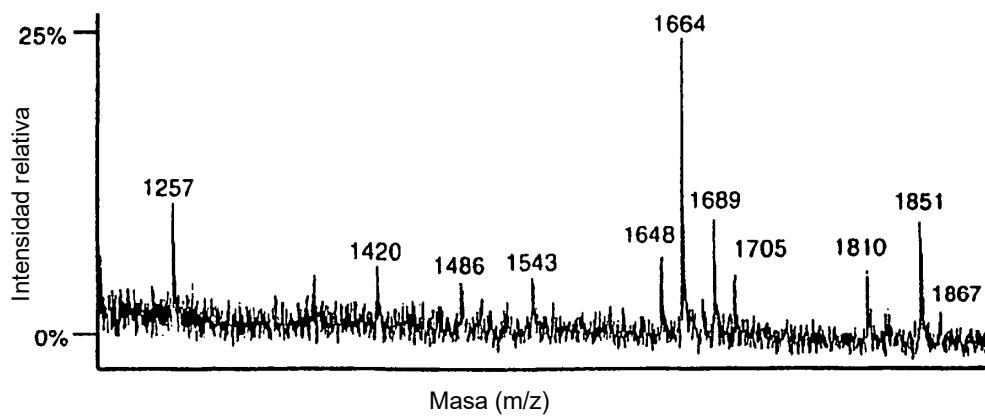


FIG.9E

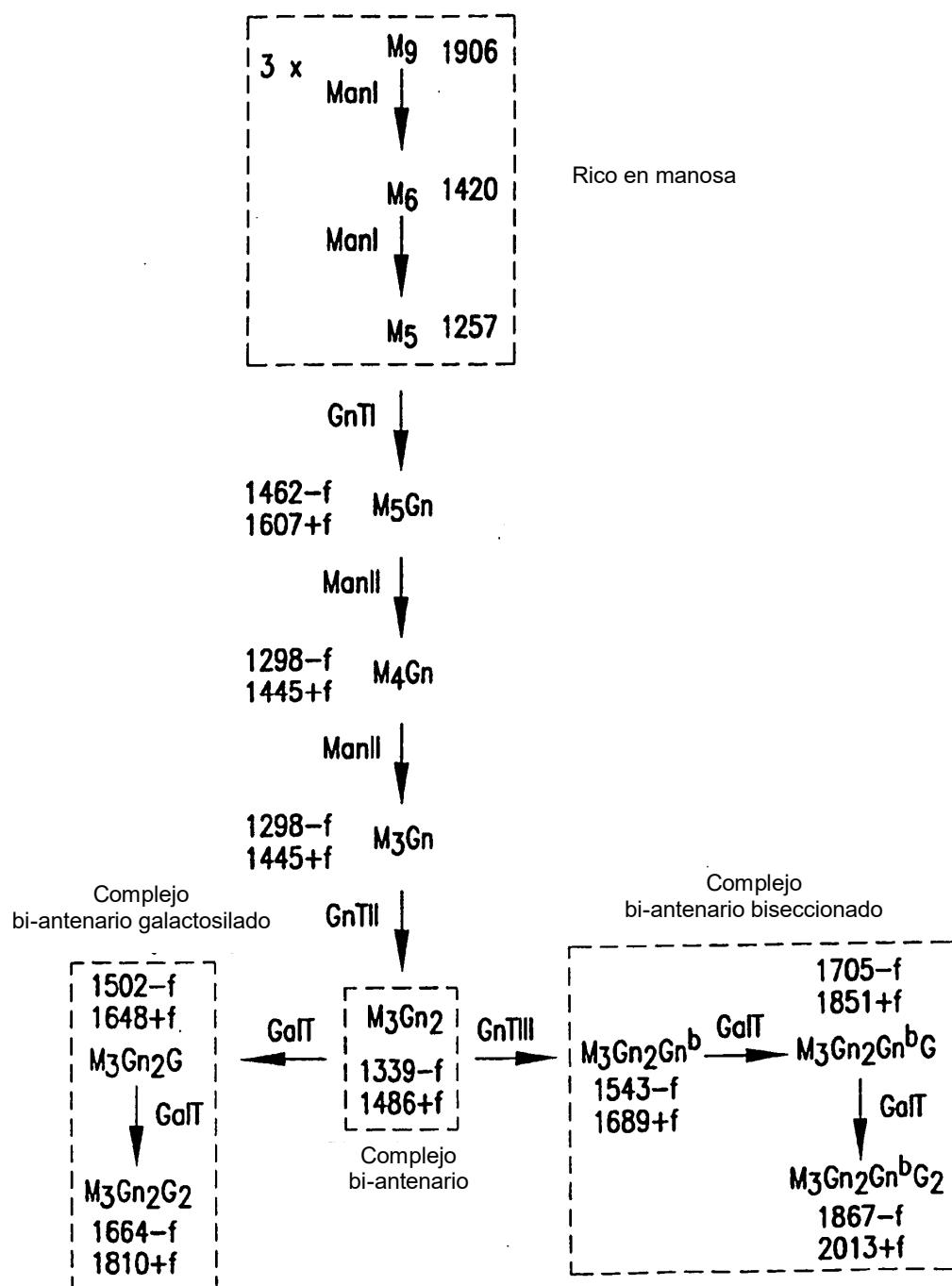


FIG.10

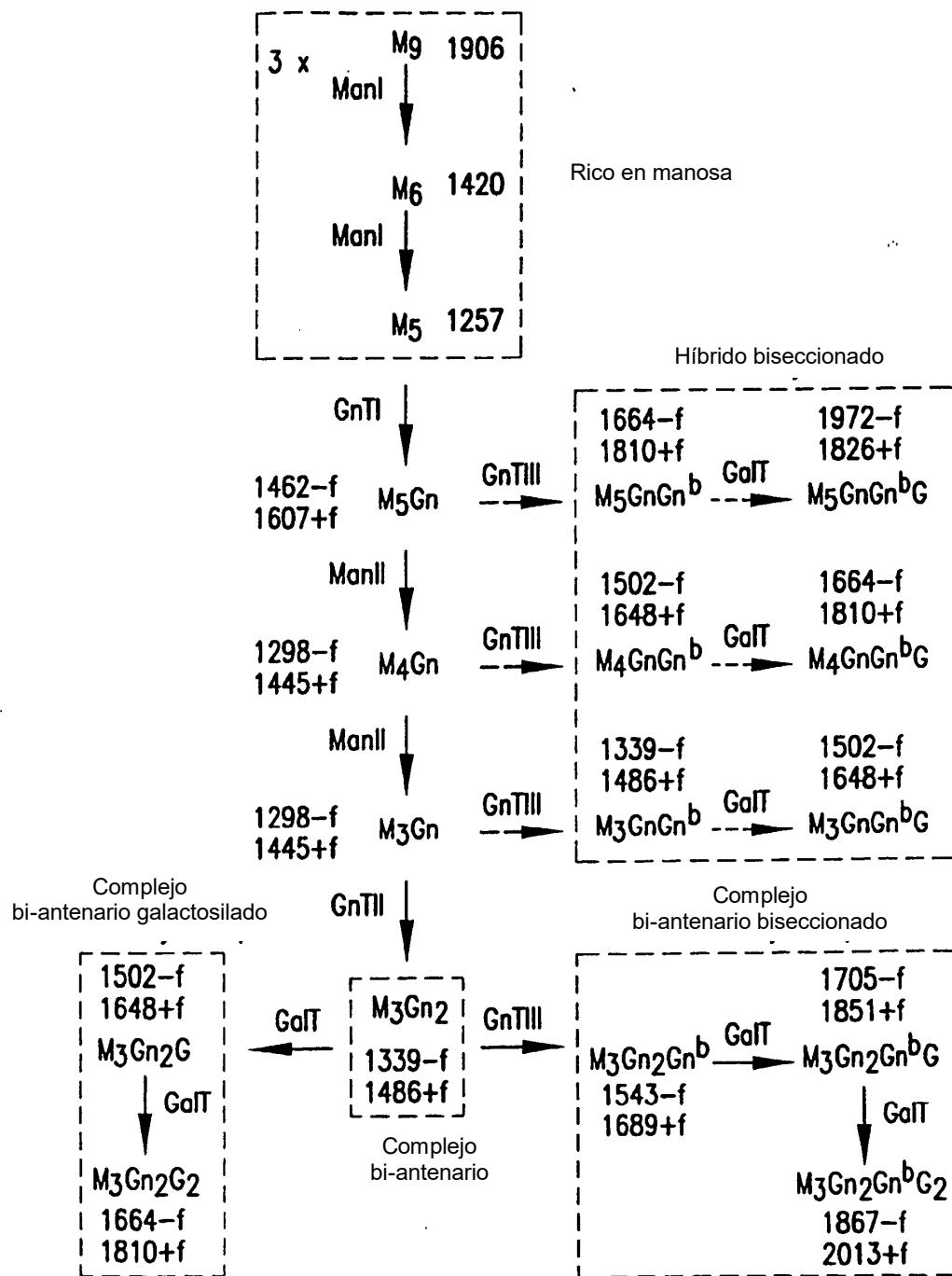


FIG.11

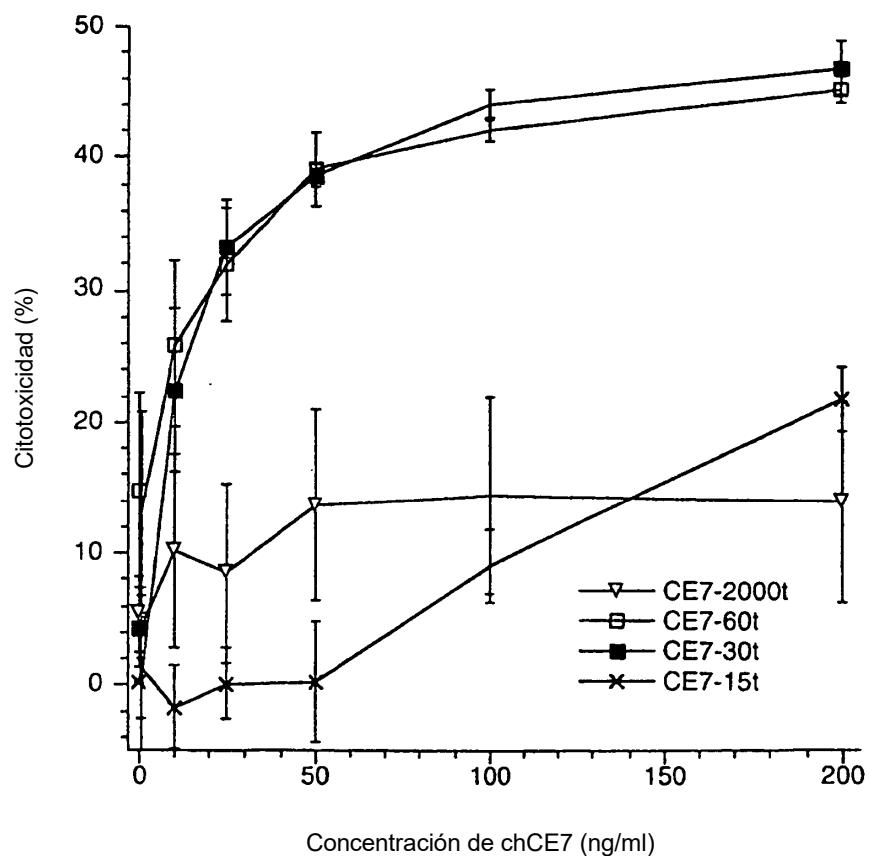


FIG.12

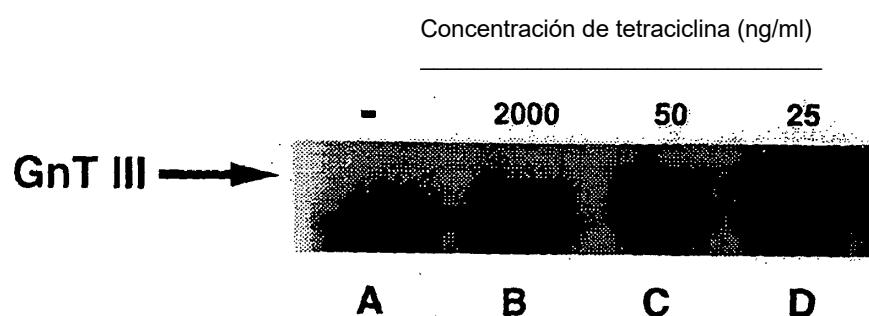


FIG.13

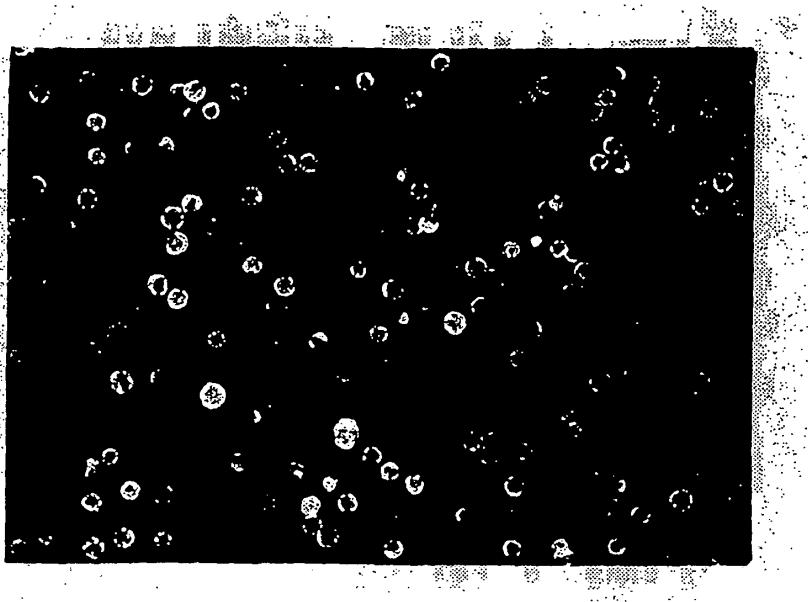


FIG.14A

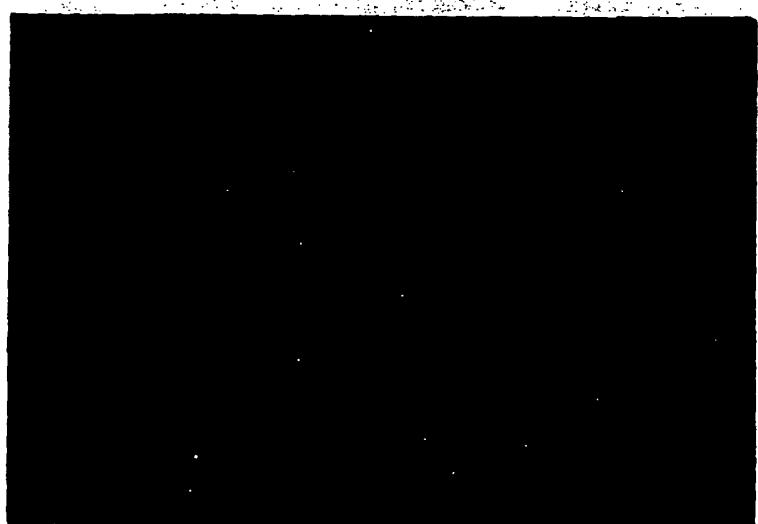


FIG.14B

FIG. 15

