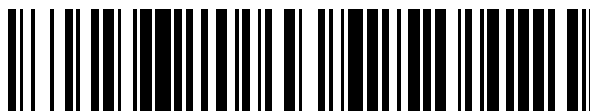


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 734**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2004** **E 10075272 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2264152**

54 Título: **Constructos de fusión y uso de los mismos para producir anticuerpos con mayor afinidad de unión al receptor de Fc y función efectora**

30 Prioridad:

**22.01.2003 US 441307 P**

**31.07.2003 US 491254 P**

**15.08.2003 US 495142 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.08.2015**

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)**

**Wagistrasse 18**

**8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**UMANA, PABLO;**

**BRUENKER, PETER;**

**FERRARA KOLLER, CLAUDIA y**

**SUTER, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 543 734 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Constructos de fusión y uso de los mismos para producir anticuerpos con mayor afinidad de unión al receptor de Fc y función efectora

## Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la modificación genética de la glicosilación de proteínas. Más en concreto, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo constructos de fusión, que tienen actividad catalítica y al uso de éstas para la modificación genética de la glicosilación de células hospedantes para generar polipéptidos con mejores propiedades terapéuticas, incluyendo anticuerpos con mayor unión al receptor de Fc y mayor función efectora.

## Antecedentes de la técnica

Las glicoproteínas median en muchas funciones esenciales en los seres humanos, otros organismos eucariotas y algunos procariotas, incluyendo la catálisis, la señalización, la comunicación célula-célula, y el reconocimiento y la asociación molecular. Forman la mayoría de las proteínas no citosólicas en los organismos eucariotas (Lis et al., Eur. J. Biochem., 218:1-27 (1993)). Muchas glicoproteínas se han aprovechado para fines terapéuticos, y durante las últimas dos décadas, las versiones recombinantes de glicoproteínas segregadas naturales han sido el producto principal de la industria biotecnológica. Los ejemplos incluyen la eritropoyetina (EPO), los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAb terapéuticos), el activador del plasminógeno tisular (tPA), el interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Cumming et al., Glycobiology, 1:115-130 (1991)).

El componente de oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades importantes para la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia a ataques de proteasas, las interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Estas propiedades pueden depender no sólo de su presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden realizarse algunas generalizaciones entre la estructura de los oligosacáridos y la función de la glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacáridos median en la rápida eliminación de la glicoproteína de la corriente sanguínea a través de interacciones con proteínas de unión a carbohidratos específicas, mientras que otras pueden ser unidas por anticuerpos y desencadenar reacciones inmunológicas no deseadas (Jenkins et al., Nature Biotechnol., 14:975-981 (1996)).

Las células de mamífero son los hospedantes preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas en la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming et al., Glycobiology, 1:115-130 (1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol., 14:975-981 (1996)). Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas, y al igual que otros tipos de hospedantes habituales, tales como células de levadura, de hongos filamentosos, de insecto y vegetales, producen unos patrones de glicosilación asociados con la rápida eliminación de la corriente sanguínea, interacciones inmunológicas no deseadas y, en algunos casos específicos, una menor actividad biológica. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido las que se han utilizado más habitualmente durante las últimas dos décadas. Además de producir unos patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación constante de líneas de células clónicas muy productivas y genéticamente estables. Éstas pueden cultivarse hasta densidades altas en biorreactores sencillos utilizando un medio exento de suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales que se emplean de modo habitual incluyen las células de riñón de cría de hámster (BHK), células de mieloma de ratón NS0 y SP/20. En fechas más recientes también se ha ensayado la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins et al., Nature Biotechnol., 14:975-981 (1996)).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, poseyendo cada isotipo una disposición exclusiva de estructuras de carbohidratos N-enlazados, que afectan de modo variable al ensamblaje de las proteínas, su secreción o su actividad funcional (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotech., 15:26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato N-enlazado unido varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos con múltiples ramificaciones y alto contenido en manosa, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotech., 15:26-32 (1997)). De forma característica, existe un procesamiento heterogéneo de las estructuras de los oligosacáridos centrales unidas en un sitio de glicosilación particular, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen como múltiples glicoformas. De manera similar, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre las líneas celulares, e incluso se observan pequeñas diferencias en una línea celular concreta cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo (Lifely, M.R. et al., Glycobiology 5(8):813-22 (1995)).

Los anticuerpos monoclonales (mAb) no conjugados pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cáncer, según ha sido demostrado por la aprobación por parte del U.S. Food and Drug Administration del rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA; y Genentech Inc., San Francisco, CA) para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano de células B CD20-positivo, de grado bajo o folicular, del trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Grillo-López, A.-J., et al., *Semin. Oncol.*, 26:66-73 (1999); Goldenberg, M.M., *Clin. Ther.*, 21:309-318 (1999)), del gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en recaída, y del alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B. El éxito de estos productos se basa no sólo en su eficacia sino también en sus extraordinarios perfiles de seguridad (Grillo-López, A.-J., et al., *Semin. Oncol.*, 26:66-73 (1999); Goldenberg, M.M., *Clin. Ther.*, 21:309-318 (1999)). A pesar de los logros de estos fármacos, actualmente existe un gran interés en obtener una actividad de anticuerpos específicos mayor que la se obtiene de modo típico con la terapia de mAb no conjugados.

Una manera de obtener un gran aumento en la potencia, manteniendo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios no deseados y significativos, es potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los mAb modificando su componente de oligosacáridos (Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17:176-180 (1999)). Los anticuerpos de tipo IgG1, que son los anticuerpos que se emplean más habitualmente en la inmunoterapia del cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación N-enlazado conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están escondidos entre los dominios CH2, formando contactos extensos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es fundamental para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology*, 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.*, 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.*, 15:26-32 (1997)).

Los presentes inventores han demostrado previamente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad ADCC in vitro de un anticuerpo modificada (véase Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17:176-180 (1999), publicación internacional n° WO 99/54342, cuyos contenidos completos se incorporan por la presente por referencia en su totalidad). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAb no conjugados que tienen una alta afinidad y especificidad de tumor pero que tienen una potencia demasiado pequeña para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas celulares industriales convencionales que carecen de la enzima GnTIII (Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17:176-180 (1999)). Este estudio fue el primero en demostrar que puede obtenerse un gran aumento en la actividad ADCC modificando genéticamente las células que producen anticuerpos para que expresen GnTIII, que también conduce a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados bisectados, por encima de los niveles que se encuentran en los anticuerpos naturales.

Los resultados de una serie de estudios sugieren que los mecanismos dependientes del receptor de Fc contribuyen sustancialmente a la acción de anticuerpos citotóxicos contra tumores, e indican que un anticuerpo óptimo contra tumores se unirá de manera preferente a los receptores de Fc de activación y de manera mínima al compañero inhibidor Fc $\gamma$ RIIB (Clynes, R.A., et al., *Nature Medicine*, 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M., y Ravetch, J.V., *J. Exp. Med.*, 195(12):1653-1659 (junio 2002)). Por ejemplo, los resultados de al menos un estudio sugieren que el receptor Fc $\gamma$ RIIIa en particular está fuertemente asociado con la eficacia de la terapia de anticuerpos (Cartron, G., et al., *Blood*, 99(3):754-757 (febrero 2002)). Este estudio demostró que los pacientes homocigóticos para Fc $\gamma$ RIIIa presentan una mejor respuesta frente al rituximab que los pacientes heterocigóticos. Los autores concluyeron que la mayor respuesta era debida a una mejor unión in vivo del anticuerpo a Fc $\gamma$ RIIIa, que produce una mejor actividad ADCC contra células de linfoma (Cartron, G., et al., *Blood*, 99(3):754-757 (febrero 2002)).

Además de ADCC, los anticuerpos monoclonales anticáncer exitosos a menudo inducen mecanismos de señalización directa independientes de Fc que regulan la supervivencia, la proliferación o la muerte de células diana mediante la activación de cascadas de señalización celular o bloqueando el acceso a factores del crecimiento (Selenko, N., et al., *J. Clin. Immunol.*, 22(3): 124-130 (2002)). Por ejemplo, el tratamiento de células B CD20+ con rituximab ha demostrado que induce la lisis mediada por el complemento y la inducción inducida por mAb de la apoptosis, así como ADCC (Selenko, N., et al., *J. Clin. Immunol.*, 22(3): 124-130 (2002)). Además, la apoptosis inducida por rituximab de células de linfoma no sólo mata a las células sino células de linfoma por células dendríticas presentadoras de antígenos (DC), induce la maduración de DC, y permite la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos. El documento WO99/54342 se refiere a células hospedantes de mamífero que expresan un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT III y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II y por ejemplo, una molécula de anticuerpo.

#### Breve resumen de la invención

Reconociendo el tremendo potencial terapéutico de los anticuerpos con mayor afinidad de unión al receptor de Fc y con mayor función efectora, los presentes inventores han desarrollado un método para producir dichos anticuerpos que implica la modificación genética del perfil de glicosilación de la región Fc del anticuerpo.

La presente invención se dirige en términos generales a métodos para glicosilificar genéticamente células hospedantes para alterar el perfil de glicosilación de uno o más polipéptidos producidos por esa célula hospedante. Los métodos de la invención pueden utilizarse para producir anticuerpos terapéuticos con glicosilación modificada genéticamente en la región Fc, incluyendo menor fucosilación, en los que los anticuerpos tienen una mayor función efectora y/o una mayor unión al receptor de Fc como resultado de la glicosilación modificada genéticamente. Los anticuerpos glicosilados genéticamente de la presente divulgación son particularmente útiles en tratamientos terapéuticos de tumores en pacientes. En una realización de la invención, las células hospedantes se glicosilifican genéticamente para que expresen una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad catalítica GnTIII o actividad catalítica GAIT. En una realización de la divulgación el constructo de GnT III se coexpresa con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad catalítica Man II humana y en una realización se coexpresa adicionalmente con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad catalítica GnTII. En otra divulgación, los polipéptidos glicosilados genéticamente de la presente invención son producidos por una célula hospedante glicosilada genéticamente para que presente una mayor expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad catalítica ManII.

Por consiguiente, en un aspecto la divulgación se dirige a invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de fusión, en el que dicho polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En una realización, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III. En una realización más, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), el dominio de localización de manosidasa I y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo. En una realización preferida, la secuencia del ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos que aparece en FIG. 24 o en FIG. 25. En otra realización preferida, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que aparece en FIG. 24 o en FIG. 25. En otra realización preferida, la secuencia del ácido nucleico aislada codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de FIG. 24 o en FIG. 25.

Otra divulgación se dirige a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de fusión, en el que dicho polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT"), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En una realización, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa. En una realización adicional, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), el dominio de localización de manosidasa I y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Otro aspecto de la divulgación se dirige a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de fusión, en el que dicho polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En una realización, el vector de expresión codifica un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III y el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, el dominio de localización de manosidasa I y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Otro aspecto de la divulgación se dirige a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de fusión, en el que dicho polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En una realización, el vector de expresión codifica un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, y el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, el dominio de localización de manosidasa I y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Otra divulgación proporciona una célula hospedante que comprende un vector de expresión descrito anteriormente.

En el presente documento se proporciona una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), y que comprende el dominio de localización en Golgi de una manosidasa II humana, en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una Fc, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII comprende el



dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III y el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

En otra divulgación se proporciona una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT") en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido de fusión que tiene actividad GAIT comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa y el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es de manosidasa II o de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I o, como alternativa, de galactosiltransferasa.

Otro aspecto se dirige a un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III. En otra realización, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

En el presente documento se proporciona un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa. En otra realización, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es de manosidasa II o de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI") o como alternativa, de galactosiltransferasa ("GalT").

En el presente documento se divulga un método para producir un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III que comprende cultivar una célula hospedante en un medio bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión, y recuperar el polipéptido de fusión del cultivo resultante. En una realización, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III. Preferentemente, el polipéptido de fusión comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

En el presente documento se proporciona un método para producir un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa que comprende cultivar una célula hospedante de la invención en un medio bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión, y recuperar el polipéptido de fusión del cultivo resultante. En una realización, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa. Preferentemente, el polipéptido de fusión comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es de manosidasa II o de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa o de galactosiltransferasa ("GalT").

En otro aspecto, se proporciona un método para modificar genéticamente el perfil de glicosilación de un polipéptido producido por una célula hospedante, que comprende introducir en la célula hospedante al menos un ácido nucleico o vector de expresión de la invención. Preferiblemente, el polipéptido es IgG o un fragmento de ésta que contiene la

región Fc del polipéptido. En una realización particularmente preferida, el polipéptido es IgG1 o un fragmento de ésta que contiene la región Fc del polipéptido. Como alternativa, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

En otro aspecto se proporciona un método para producir un polipéptido en una célula hospedante, que comprende: (a) cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III o, como alternativa  $\beta(1-4)$ -N-acetilgalactosiltransferasa ("GalT"), bajo condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante; y (b) aislar dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante. Preferiblemente, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III o  $\beta(1-4)$ -N-acetilgalactosiltransferasa ("GalT") y comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1-6$  fucosiltransferasa de núcleo. En realizaciones preferidas, el polipéptido producido por la célula hospedante tiene mayor función efectora y/o mayor unión al receptor de Fc como resultado de la modificación genética. En realizaciones particularmente preferidas, la mayor función efectora es una mayor citotoxicidad celular mediada por Fc, una mayor unión a células NK, una mayor unión a macrófagos, una mayor unión a monocitos, una mayor unión a células polimorfonucleares, una mayor señalización directa inductora de la apoptosis, una mayor maduración de células dendríticas y/o un mayor cebado de células T, y la mayor unión al receptor de Fc es una mayor unión a un receptor activado de Fc, tal como Fc $\gamma$ RIIA. Preferiblemente, el polipéptido que muestra una mayor función efectora y/o una mayor unión al receptor de Fc es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión que comprende una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, y tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc.

En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende al anticuerpo, al fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o al polipéptido de fusión que contiene la región Fc de una inmunoglobulina de la divulgación y el uso de dicha composición farmacéutica en el tratamiento de tumores, tales como cáncer u otros trastornos. En una realización, el tratamiento es eliminación de linfocitos B administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición a un paciente, por ejemplo, a un ser humano que lo necesite.

En una divulgación adicional más se proporciona una célula hospedante de levadura o de insecto, que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, en la que dicho polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi; y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que dicho polipéptido tiene actividad manosidasa II (ManII). En realizaciones preferidas, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de ManII, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de GnTII, el dominio de localización de ManI y el dominio de localización de  $\alpha 1-6$  fucosiltransferasa de núcleo. En una realización, la célula hospedante comprende además un vector de expresión que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTII. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de fusión, el polipéptido que tiene actividad ManII, y el polipéptido que tiene actividad GnTII pueden estar cada uno en vectores de expresión diferentes o en el mismo vector de expresión.

Se proporciona una célula hospedante que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, en el que dicho polipéptido de fusión tiene actividad de  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT) y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi, y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que dicho polipéptido tiene actividad de manosidasa II (Man II). En realizaciones preferidas, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de ManII, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de GnTII, el dominio de localización de ManI, y el dominio de localización de  $\alpha 1-6$  fucosiltransferasa de núcleo. En una realización, la célula hospedante comprende además un vector de expresión que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnTII. Las moléculas de ácido nucleico que codifican al polipéptido de fusión, al polipéptido que tiene actividad de ManII y al polipéptido que tiene actividad de GnTII pueden estar cada una en vectores de expresión separados o en el mismo vector de expresión.

La invención se dirige a una célula hospedante de mamífero o de levadura modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnTIII y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la

región Fc de una inmunoglobulina.

En una realización adicional, la invención proporciona una célula hospedante de mamífero o levadura modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnTIII, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnTII en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa; un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

En una divulgación adicional se proporciona una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GalT y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

Una divulgación adicional proporciona una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GalT, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnTII, en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante de mamífero o de levadura que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnTIII y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante, y aislar dicho polipéptido.

Una divulgación se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GalT y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de ManII en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante; y aislar dicho polipéptido.

En una divulgación adicional, se proporciona un método para producir un polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada en una célula hospedante, que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica GalT y al menos un ácido nucleico que codifica ManII en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que incluye la región Fc de una inmunoglobulina, en el que el nivel de expresión de uno o ambos GalT y ManII es suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante y en el que dicho polipéptido tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada como resultado de dicha modificación genética; y aislar dicho polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

En otro aspecto adicional, la presente invención se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante que comprende (a) cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -Manosidasa II en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -Manosidasa II se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante; y (b) aislar dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante.

En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -Manosidasa II en condiciones que

permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -Manosidasa II se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante.

En otro aspecto más, la presente divulgación se dirige a polipéptidos producidos por dichas células hospedantes, particularmente anticuerpos que tienen función efectora aumentada y/o unión a receptor de Fc aumentada como resultado de dichos oligosacáridos modificados genéticamente.

## Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, no modificado (no glicomodificado genéticamente) producido en BHK. Las células se transfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1502. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 2. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, glicomodificado genéticamente producido en BHK modificadas con un ácido nucleico que codifica la GnTIII de tipo salvaje ("ts"). Las células se cotransfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1502 y con el vector de expresión de GnTIII pETR1166. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 3. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, glicomodificado genéticamente producido en BHK modificadas genéticamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ("G1- GnTIII") con actividad GnTIII y localizado a través de un dominio de localización en Golgi de GnTI. Las células se cotransfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1502 y con el vector de expresión de GnTIII pETR1425. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 4. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, glicomodificado genéticamente producido en BHK modificadas genéticamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ("M2- GnTIII") con actividad GnTIII y localizado a través de un dominio de localización en Golgi de la alfa-manosidasa II (Man II). Las células se cotransfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1502 y con el vector de expresión de GnTIII pETR1506. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 5. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, no modificado (no glicomodificado genéticamente) producido en células HEK293-EBNA. Las células se transfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 6. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, glicomodificado genéticamente producido en HEK293-EBNA modificadas genéticamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ("M2-GnTIII") con actividad GnTIII y localizado a través de un dominio de localización en Golgi de la alfa-manosidasa II (Man II). Las células se cotransfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520 y con el vector de expresión de GnTIII pETR1519. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 7. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 anti-CD20 recombinante, glicomodificado genéticamente producido en HEK293-EBNA modificadas genéticamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión ("M2-GnTIII") con actividad GnTIII y localizado a través de un dominio de localización en Golgi de la alfa-manosidasa II (Man II). Las células se cotransfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520 y con el vector de expresión de GnTIII pETR1519. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. (a) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF sin tratamiento enzimático adicional. (b) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF digeridos después con EndoH.

FIG. 8. (a) Descripción esquemática de la digestión catalizada por EndoH de oligosacáridos. La EndoH puede digerir oligosacáridos híbridos (e híbridos bisectados), pero no oligosacáridos complejos o complejos bisectados. (b) Distinguiendo entre los oligosacáridos de tipo complejo e híbrido, el tratamiento con EndoH permite realizar asignaciones estructurales a picos de oligosacáridos que tengan la misma proporción m/z en los espectros de MALDI/TOF-MS que surgieron originariamente del tratamiento con PNGasaF.

FIG. 9. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "G1 -GnTIII". Ambos anticuerpos fueron producidos en células BHK. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 3, y del anticuerpo no modificado en la figura 1. Las células diana (D) fueron

células linfoblastoides humanas SKW 6.4. Las células efectoras (E) fueron PBMC humanas recién aisladas. Se empleó una proporción E:T de 25:1 en un ensayo ADCC de 4 horas de incubación, midiendo la citotoxicidad mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) con relación a controles de liberación máxima (utilizando un detergente en lugar de un anticuerpo) y de liberación espontánea (con medio de cultivo en lugar de anticuerpo). Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 10. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII". Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 6, y del anticuerpo no modificado en la figura 5. Las células diana (D) fueron células linfoblastoides humanas SKW6.4. Las células efectoras (E) fueron PBMC humanas recién aisladas. Se empleó una proporción E:T de 25:1 en un ensayo ADCC de 4 horas de incubación, midiendo la citotoxicidad mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) con relación a controles de liberación máxima (utilizando un detergente en lugar de un anticuerpo) y de liberación espontánea (con medio de cultivo en lugar de anticuerpo). Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 11. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes glicomodificados genéticamente con "ts- GnTIII" frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII". Ambos anticuerpos fueron producidos en células BHK. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente con M2-GnTIII se muestra en la figura 4, y del anticuerpo glicomodificado genéticamente con ts-GnTIII en la figura 2. Las células diana (D) fueron células linfoblastoides humanas SKW6.4. Las células efectoras (E) fueron PBMC humanas recién aisladas. Se empleó una proporción E:T de 25:1 en un ensayo ADCC de 4 horas de incubación, midiendo la citotoxicidad mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) con relación a controles de liberación máxima (utilizando un detergente en lugar de un anticuerpo) y de liberación espontánea (con medio de cultivo en lugar de anticuerpo). Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 12. Unión de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII" al receptor FcγRIIIa sobre células NK. Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 6, y del anticuerpo no modificado en la figura 5. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. Se aislaron células NK humanas que expresan el receptor FcγRIIIa sobre su superficie a partir de un donante de un genotipo del cual se sabe que no produce el receptor FcγRIIc (es decir, homocigótico para un variante génico que contiene un codón de fin dentro del marco dentro de la secuencia codificadora de FcγRIIc). La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células NK. La unión detectada en este ensayo es específica de FcγRIIIa, según se demuestra mediante el uso de un fragmento de anticuerpo específico de FcγRIIIa competitivo (véase la figura 13).

FIG. 13. Unión de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII" al receptor FcγRIIIa sobre células NK en presencia de concentraciones crecientes de un fragmento de anticuerpo anti-FcγRIII competitivo. Ambos anticuerpos recombinantes fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 6, y del anticuerpo no modificado en la figura 5. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1, pero coincurando las células NK purificadas con el anticuerpo recombinante (siempre a una concentración final de 3 µg/ml) y con concentraciones crecientes y variables (véase la gráfica) del fragmento de anticuerpo anti-FcγRIII 3GB-Fab2 competitivo. Se aislaron células NK humanas que expresan el receptor FcγRIIIa sobre su superficie a partir de un donante de un genotipo del cual se sabe que no produce el receptor FcγRIIc (es decir, homocigótico para un variante génico que contiene un codón de fin dentro del marco dentro de la secuencia codificadora de FcγRIIc). La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células NK.

FIG. 14. Espectros de MALDI/TOF-MS de mezclas de oligosacáridos neutros derivados de anticuerpos IgG1 "L19" recombinantes que reconocen la isoforma ED-B+ y producidos en células HEK293-EBNA. (a) Anticuerpo no modificado producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1546. (b) Anticuerpo glicomodificado genéticamente con M2-GnTIII producido en células HEK293-EBNA cotransfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1546 y el vector de expresión de GnTIII pETR1519. Ambos anticuerpos se purificaron a partir del medio de cultivo mediante una cromatografía de afinidad de proteína A, seguida de una etapa de cromatografía de exclusión molecular en una matriz Superdex200 (Amersham), cambiando el tampón a solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 15. Unión de anticuerpos IgG1 anti-ED-B+fibronectina recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII" al receptor FcγRIIb sobre células de linfoma humano Raji. Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 14b, y del anticuerpo no modificado en la figura 14a. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana

marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células de linfoma de células B Raji.

FIG. 16. Unión de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII" al receptor FcgammaRIIIa sobre células NK de donantes diferentes. Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 6, y del anticuerpo no modificado en la figura 5. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. Se aislaron células NK humanas que expresan el receptor FcgammaRIIIa sobre su superficie a partir de donantes de un genotipo del cual se sabe que no produce el receptor FcgammaRIIc (es decir, homocigóticos para un variante génico que contiene un codón de fin dentro del marco dentro de la secuencia codificadora de FcgammaRIIc). Dos donantes se genotiparon como homocigóticos para el variante de "mayor afinidad" por 158V del receptor FcgammaRIIIa. Los otros dos donantes se genotiparon como heterocigóticos 158V/F para los variantes de "mayor afinidad" por 158V y de "menor afinidad" por 158V del receptor FcgammaRIIIa. La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células NK. La unión detectada en este ensayo es específica de FcgammaRIIIa, según se demuestra mediante el uso de un fragmento de anticuerpo específico de FcgammaRIIIa competitivo (véase la figura 13).

FIG. 17. Análisis FACS de la expresión de CD4-truncada (tCD4) de las líneas celulares productoras de anticuerpos IgG1 anti-CD20 quiméricas estables (a) BHK- 1502-28 (tipo salvaje), y (b) clon BHK-1502-28-11 (glicomodificada genéticamente con M2-GnTIII). La expresión de tCD4 está operablemente unida a la expresión de M2-GnTIII a través de un elemento IRES en el vector de expresión de GnTIII pETR1537 y, por tanto, se utiliza como marcador indirecto para la expresión de GnTIII. Las intensidades de fluorescencia media y media geométrica fueron, respectivamente, 27,6 y 19,9 para las líneas células glicomodificadas genéticamente, y 4,7 y 1,4 para las líneas celulares de tipo salvaje.

FIG. 18. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 recombinante glicomodificado genéticamente con M2-GnTIII producido por la línea celular BHK-1502-28-11. La línea celular, la purificación del anticuerpo y la preparación y el análisis de los oligosacáridos se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 19. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados, mediante oligosacáridos liberados con PNGasaF y una posterior digestión con EndoH, de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 recombinante glicomodificado genéticamente con M2-GnTIII producido por la línea celular BHK-1502-28-11. La línea celular, la purificación del anticuerpo y la preparación y el análisis de los oligosacáridos se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 20. Unión de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII", producidos por líneas celulares estables, al receptor FcgammaRIIIa sobre células NK. El perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en las figuras 18 y 19. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. Se aislaron células NK humanas que expresan el receptor FcgammaRIIIa sobre su superficie a partir de un donante de un genotipo del cual se sabe que no produce el receptor FcgammaRIIc (es decir, homocigótico para un variante génico que contiene un codón de fin dentro del marco dentro de la secuencia codificadora de FcgammaRIIc). La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células NK. La unión detectada en este ensayo es específica de FcgammaRIIIa, según se demuestra mediante el uso de un fragmento de anticuerpo específico de FcgammaRIIIa competitivo (véase la figura 13).

FIG. 21. Lisis mediada por el complemento (CML) de anticuerpos IgG1 quiméricos anti-CD20 recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII". Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 6, y del anticuerpo no modificado en la figura 5. Las células diana (D) fueron células linfoblastoides humanas SKW6.4. Se utilizó el complemento humano para el ensayo. La lisis se midió mediante la liberación de LDH. Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 22. Espectros de MALDI/TOF-MS de mezclas de oligosacáridos neutros derivados de anticuerpos IgG1 "C225" quiméricos recombinantes que reconocen al receptor del factor del crecimiento epidérmico humano (EGFR), y producidos en células HEK293-EBNA. (a) Anticuerpo no modificado producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pURSI28. (b) Anticuerpo glicomodificado genéticamente con M2-GnTIII producido en células HEK293-EBNA cotransfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETRURSI28 y el vector de expresión de GnTIII pETR1519. Ambos anticuerpos se purificaron a partir del medio de cultivo mediante una cromatografía de afinidad de proteína A, seguida de una etapa de cromatografía de exclusión molecular en una matriz Superdex200 (Amersham), cambiando el tampón a solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 23. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos IgG1 "C225" quiméricos anti-EGFR recombinantes no modificados frente a glicomodificados genéticamente con "M2-GnTIII". Ambos anticuerpos fueron producidos en células HEK293-EBNA. La producción y el perfil de glicosilación del anticuerpo glicomodificado genéticamente se muestra en la figura 22b, y del anticuerpo no modificado en la figura 22a. Las células diana (D) fueron células de carcinoma escamoso humano A431 (ECACC n° 85090402). Las células efectoras (E) fueron PBMC humanas recién aisladas. Se empleó una proporción E:T de 25:1 en un ensayo ADCC

de 4 horas de incubación, midiendo la citotoxicidad mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) con relación a controles de liberación máxima (utilizando un detergente en lugar de un anticuerpo) y de liberación espontánea (con medio de cultivo en lugar de anticuerpo). Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 24. Secuencia del ácido nucleico y secuencia de aminoácidos, respectivamente, del polipéptido de fusión de manosidasa II-GnTIII.

FIG. 25. Secuencia del ácido nucleico y secuencia de aminoácidos, respectivamente, del polipéptido de fusión de GnTI-GnTIII.

FIG. 26. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante no modificado ("Cwt"; wt-"wild type", tipo salvaje) producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520. El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 5.

FIG. 27. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante glicosilado genéticamente ("Cbrt") producido en células HEK293-EBNA cotransfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520 y con el vector de expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519). El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 5. (a) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF sin tratamiento enzimático adicional. (b) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF digeridos después con EndoH.

FIG. 28. Espectro de MALDI/TOF-MS de una mezcla de oligosacáridos neutros derivados de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante glicosilado genéticamente ("Cm") producido en células HEK293-EBNA cotransfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520, el vector de expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519), y el vector de expresión de polipéptido manosidasa II (pCLF9). El anticuerpo se purificó a partir del medio de cultivo y los oligosacáridos se prepararon y se analizaron como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 5. (a) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF sin tratamiento enzimático adicional. (b) Perfil de oligosacáridos de oligosacáridos liberados con PNGasaF digeridos después con EndoH.

FIG. 29. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por anticuerpos anti-CD20 quiméricos glicosilados genéticamente mediante la expresión en células HEK293-EBNA de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, en el que el ácido nucleico que codifica ManII-GnTIII se expresa por sí solo (anticuerpo Cbrt) o se coexpresa en las células productoras de anticuerpos junto con un ácido nucleico que codifica ManII (Cm). El Cwt es el anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante no modificado ("Cwt") producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520. Los detalles del ensayo se describen en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1.

FIG. 30. Unión al receptor FcγRIIIa de anticuerpos anti-CD20 quiméricos glicosilados genéticamente mediante la expresión en células HEK293-EBNA de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, en el que el ácido nucleico que codifica ManII-GnTIII se expresa por sí solo (anticuerpo Cbrt) o se coexpresa en las células productoras de anticuerpos junto con un ácido nucleico que codifica ManII (Cm). El Cwt es el anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante no modificado ("Cwt") producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520. El ensayo de unión se realizó como se describe en la sección de Materiales y métodos del ejemplo 1. Se aislaron células NK humanas que expresan el receptor FcγRIIIa sobre su superficie a partir de un donante de un genotipo del cual se sabe que no produce el receptor FcγRIIIc (es decir, homocigótico para un variante génico que contiene un codón de fin dentro del marco dentro de la secuencia codificadora de FcγRIIIc). La intensidad de fluorescencia media geométrica, medida mediante FACS utilizando un fragmento de anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC, aumenta con la cantidad de anticuerpo recombinante unido a las células NK. La unión detectada en este ensayo es específica de FcγRIIIa, según se demuestra mediante el uso de un fragmento de anticuerpo específico de FcγRIIIa competitivo (véase la figura 13).

FIG. 31. Citotoxicidad mediada por el complemento de anticuerpos anti-CD20 quiméricos glicosilados genéticamente mediante la expresión en células HEK293-EBNA de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, en el que el ácido nucleico que codifica ManII-GnTIII se expresa por sí solo (anticuerpo Cbrt) o se coexpresa en las células productoras de anticuerpos junto con un ácido nucleico que codifica ManII (Cm). El Cwt es el anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante no modificado ("Cwt") producido en células HEK293-EBNA transfectadas con el vector de expresión de anticuerpos pETR1520.

FIG. 32 (A-C). Vectores de expresión pCLF9 (A), pETR1842 (B), y pETR1843 (C).

FIG. 33 (A y B). Vectores de expresión para la proteína de fusión de ManII-GalT (A) y GalT (B).

FIG. 34. Perfil de oligosacáridos de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 producido en presencia de α-manosidasa II y los porcentajes relativos de las estructuras que se encuentran asociadas con la porción Fc del anticuerpo.

FIG. 35 (A y B). Perfil de oligosacáridos de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 producido en presencia de la proteína de fusión de ManII-GalT y los porcentajes relativos de las estructuras que se encuentran asociadas con la porción Fc del anticuerpo. Perfiles de oligosacáridos después de una digestión con PNGasaF (A) y EndoH (B).

FIG. 36. Anticuerpo producido en presencia de α-manosidasa II (ManII) que se une al receptor FcγRIIIA con mayor

afinidad que los anticuerpos de tipo salvaje.

FIG. 37. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por anti- CD20 quimérico glicomodificado genéticamente.

## 5 Descripción detallada de la invención

Los términos se emplean en la presente como se utilizan de modo general en la técnica, a menos que se definan de otra forma como se indica a continuación.

10 Tal como se emplea en la presente, el término anticuerpo pretende incluir moléculas de anticuerpos completas, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpos que tengan la región Fc, y proteínas de fusión que incluyan una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. También se incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos.

15 Tal como se emplea en la presente, la expresión región Fc se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de la cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana normalmente se define como que abarca desde el resto aminoácido en la posición Cys226 al carboxilo-terminal.

20 Tal como se emplea en la presente, la expresión región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina pretende incluir los variantes alélicos naturales de la región Fc de una inmunoglobulina, así como los variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones, pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden delecionarse del N-terminal o del C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin una pérdida sustancial de la función biológica. Estos variantes pueden seleccionarse  
25 según reglas generales conocidas en la técnica para que tengan un efecto mínimo sobre la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J.U. et al., Science, 247:1306-1310 (1990).

30 Tal como se emplea en la presente, un polipéptido de fusión "que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III" se refiere a polipéptidos de fusión que son capaces de catalizar la adición de un resto N-acetilglucosamina (GlcNAc) en enlace  $\beta$ -1-4 al manósido  $\beta$ -enlazado del núcleo de trisacárido de oligosacáridos N- enlazados. Esto incluye polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a la actividad de la  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como  $\beta$ -1,4-manosil-glicoproteína 4- beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144), según el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en que exista dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, sino que puede ser sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada comparada con la  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III (es decir, el polipéptido candidato mostrará mayor actividad o una actividad no más de aproximadamente 25 veces menor, y preferiblemente una actividad no más de aproximadamente 10 veces menor, y lo más preferiblemente una actividad no más de aproximadamente tres menor con relación a la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III).

45 Tal como se emplea en la presente, un polipéptido de fusión "que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa" o "que tiene actividad GalT" se refiere a polipéptidos de fusión que son capaces de catalizar la adición de un resto galactosa de UDP-galactosa al terminal GlcNAc no reductor en oligosacáridos N-enlazados. Esto incluye polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a la actividad de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, también conocida como UDP-Gal:GlcNAc- $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.38), según el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en que exista dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la de la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, sino que puede ser sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada comparada con la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (es decir, el polipéptido candidato mostrará mayor actividad o una actividad no más de aproximadamente 25 veces menor, y preferiblemente una actividad no más de aproximadamente 10 veces menor, y lo más preferiblemente una actividad no más de aproximadamente tres menor con relación a la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III).

55 Un ácido nucleico o un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo 95 %, "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente divulgación se refiere a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a la  
60 secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden delecionarse o sustituirse por otro nucleótido, o una serie de nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. La secuencia pregunta puede ser la secuencia completa que aparece en FIG. 24 o FIG. 25.

65 Como cuestión práctica, cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular que sea al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos o secuencia de polipéptido de la presente



divulgación puede determinarse de modo convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia pregunta (una secuencia de la presente divulgación) y una secuencia caso, también denominado alineamiento de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990). En el alineamiento de secuencias, las secuencias pregunta y caso son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse convirtiendo las T en U. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global se indica en porcentaje de coincidencia. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de coincidencia son: Matriz = unitaria, k-tuple = 4, penalización de desapareamiento = 1, penalización de unión = 30, longitud del grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, penalización de hueco = 5, penalización del tamaño de hueco = 0,05, tamaño de la ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos caso, lo que sea más corto.

Si la secuencia caso es más corta que la secuencia pregunta por delecciones 5' o 3', no debido a delecciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos 5' y 3' de la secuencia caso cuando calcula el porcentaje de coincidencia. Para las secuencias caso truncadas en los extremos 5' o 3', con relación a la secuencia pregunta, el porcentaje de coincidencia se corrige calculando el número de bases de la secuencia pregunta que están 5' y 3' de la secuencia caso, que no estén apareadas/alineadas, como porcentaje de las bases totales de la secuencia pregunta. Si un nucleótido está apareado/alineado se determina a partir de los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. Este porcentaje entonces se resta del porcentaje de coincidencia, calculado por el anterior programa FASTDB utilizando los parámetros especificados, para obtener una puntuación de porcentaje de coincidencia final. Esta puntuación corregida es la que se emplea para los fines de la presente divulgación. Sólo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia caso, según se muestra en el alineamiento FASTDB, que no estén apareadas/alineadas con la secuencia pregunta, se calculan para poder ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de coincidencia.

Por ejemplo, una secuencia caso de 90 bases se alinea con una secuencia pregunta de 100 bases para determinar el porcentaje de coincidencia. Las delecciones se producen en el extremo 5' de la secuencia caso y, por tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases desapareadas representan 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' que no están apareadas/número total de bases en la secuencia pregunta), de forma que se resta 10 % de la puntuación de porcentaje de coincidencia calculada por el programa FASTDB. Si el resto de las 90 bases estuviesen perfectamente apareadas, el porcentaje de coincidencia final sería 90 %. En otro ejemplo, una secuencia caso de 90 bases se compara con una secuencia pregunta de 100 bases. Esta vez las delecciones son delecciones internas, de modo que no existen bases en el extremo 5' o 3' de la secuencia caso que no estén apareadas/alineadas con la secuencia pregunta. En este caso, el porcentaje de coincidencia calculado por FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, sólo las bases 5' y 3' de la secuencia caso que no estén apareadas/alineadas con la secuencia pregunta se corrigen manualmente. No se hacen más correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

Un polipéptido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo 95 %, "idéntica" a una secuencia de nucleótidos pregunta de la presente invención se refiere a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido caso es idéntica a la secuencia pregunta excepto que la secuencia del polipéptido caso puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos pregunta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos pregunta, hasta 5 % de los restos aminoácidos en la secuencia pregunta pueden insertarse, deleccionarse o sustituirse por otro aminoácido. Estas alteraciones en la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino- o carboxi- terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier punto entre estas posiciones terminales, intercaladas de modo individual entre restos en la secuencia de referencia, o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como cuestión práctica, cualquier polipéptido particular que sea al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a un polipéptido de referencia puede determinarse de modo convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia pregunta (una secuencia de la presente divulgación) y una secuencia caso, también denominado alineamiento de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990). En el alineamiento de secuencias, las secuencias pregunta y caso son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global se indica en porcentaje de coincidencia. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento FASTDB de aminoácidos son: Matriz = PAM 0, k-tuple = 2, penalización de desapareamiento = 1, penalización de unión = 20, longitud del grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, tamaño de la ventana = longitud de la secuencia, penalización de hueco = 5, penalización del tamaño de hueco = 0,05, tamaño de la ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos caso, lo que sea más corto.

Si la secuencia caso es más corta que la secuencia pregunta debido a delecciones N- o C-terminales, no debido a delecciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia caso cuando calcula el porcentaje de coincidencia global. Para las secuencias caso truncadas en los extremos N- o C-terminales, con relación a la

secuencia pregunta, el porcentaje de coincidencia se corrige calculando el número de restos de la secuencia pregunta que están N- y C-terminales de la secuencia caso, que no estén apareados/alineados con un correspondiente resto caso, como porcentaje de las bases totales de la secuencia pregunta. Si un resto está apareado/alineado se determina a partir de los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. Este porcentaje entonces se resta del porcentaje de coincidencia, calculado por el anterior programa FASTDB utilizando los parámetros especificados, para obtener una puntuación de porcentaje de coincidencia final. Esta puntuación de porcentaje de coincidencia final es la que se emplea para los fines de la presente divulgación. Sólo los restos a N- y C-terminal de la secuencia caso que no estén apareados/alineados con la secuencia pregunta, se consideran para poder ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de coincidencia, es decir, sólo las posiciones de restos caso fuera de los restos N- y C-terminales más alejados de la secuencia caso.

Por ejemplo, una secuencia caso de 90 restos aminoácidos se alinea con una secuencia pregunta de 100 restos para determinar el porcentaje de coincidencia. La delección se produce en el extremo N-terminal de la secuencia caso y, por tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de los primeros 10 restos en el N-terminal. Los 10 restos desapareados representan 10 % de la secuencia (número de restos en los extremos N- y C-terminales que no están apareados/número total de restos en la secuencia pregunta), de forma que se resta 10 % de la puntuación de porcentaje de coincidencia calculada por el programa FASTDB. Si el resto de los 90 restos estuviesen perfectamente apareados, el porcentaje de coincidencia final sería 90 %. En otro ejemplo, una secuencia caso de 90 restos se compara con una secuencia pregunta de 100 restos. Esta vez las delecciones son delecciones internas, de modo que no existen restos en el extremo N- o C-terminal de la secuencia caso que no estén apareados/alineados con la secuencia pregunta. En este caso, el porcentaje de coincidencia calculado por FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, sólo las posiciones de restos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia caso, según se muestra en el alineamiento FASTDB, que no estén apareados/alineados con la secuencia pregunta, se corrigen manualmente. No se hacen más correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

Tal como se emplea en la presente, un ácido nucleico que "se hibrida bajo condiciones rigurosas" con una secuencia de ácido nucleico de la divulgación se refiere a un polinucleótido que se hibrida en una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50 %, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado 20 µg/ml, seguido del lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C.

Tal como se emplea en la presente, la expresión dominio de localización en Golgi se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclarlo en su sitio dentro del complejo de Golgi. En general, los dominios de localización comprenden las "colas" amino-terminales de una enzima.

Tal como se emplea en la presente, la expresión función efectora se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a la afinidad de unión al receptor de Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), la secreción de citoquinas, la captación de antígenos mediada por el complejo inmunológico por células presentadoras de antígenos, la infrarregulación de receptores en la superficie celular, etc.

Tal como se emplean en la presente, los términos modificar genéticamente, modificado genéticamente modificación genética y la expresión modificación genética de la glicosilación se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido natural o su fragmento. La modificación genética de la glicosilación incluye la modificación genética metabólica de la maquinaria de glicosilación de una célula, incluyendo las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de oligosacáridos para lograr una glicosilación alterada de las glicoproteínas expresadas en células. Además, la modificación genética de la glicosilación incluye los efectos de las mutaciones y del entorno celular sobre la glicosilación.

Tal como se emplea en la presente, la expresión célula hospedante abarca cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse genéticamente para generar glicofomas modificadas genéticamente de proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos de interés, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y proteínas de fusión. De forma característica, las células hospedantes se han manipulado para que expresen niveles optimizados de GnTIII. Las células hospedantes incluyen células cultivadas, por ejemplo células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar unas pocas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, una planta transgénica o un tejido vegetal o animal cultivado.

Tal como se emplea en la presente, la expresión citotoxicidad celular mediada por Fc incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión de Fc soluble que contenga una región Fc humana. Es un mecanismo inmunológico que conduce a la lisis de "células diana de anticuerpos" por las "células efectoras inmunológicas humanas", en el que:

las "células efectoras inmunológicas humanas" son una población de leucocitos que muestran receptores de Fc sobre

su superficie a través de los cuales se unen a la región Fc de anticuerpos o de proteínas de fusión de Fc, y realizan funciones efectoras. Esta población puede incluir, pero no se limita a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

- 5 Las "células diana de anticuerpos" son células a las cuales se unen los anticuerpos o las proteínas de fusión de Fc. Los anticuerpos o las proteínas de fusión de Fc se unen a las células diana a través de la parte de la proteína N-terminal a la región Fc.

10 Tal como se emplea en la presente, la expresión mayor citotoxicidad celular mediada por Fc se define como un aumento en el número de "células diana de anticuerpos" que son lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo o de proteína de fusión de Fc, en el medio que rodea a las células diana, mediante el mecanismo de la citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente y/o por una reducción en la concentración de anticuerpo o de proteína de fusión de Fc en el medio que rodea a las células diana, requerida para lograr la lisis de un número dado de "células diana de anticuerpos", en un tiempo dado mediante el mecanismo de la citotoxicidad celular mediada por Fc. El aumento en la citotoxicidad celular mediada por Fc se relaciona con la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo o proteína de fusión de Fc, producidos por el mismo tipo de células hospedantes, utilizando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y conservación, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no han sido producidos por células hospedantes modificadas genéticamente para que expresen la glicosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos en la presente.

20 Un anticuerpo que tiene mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) significa un anticuerpo que tiene una mayor ADCC según se determina mediante cualquier método adecuado conocidos por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC in vitro aceptado es como sigue:

- 25 1) el ensayo emplea células diana de las cuales se sabe que expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión al antígeno del anticuerpo;  
2) el ensayo emplea células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC), aisladas a partir de la sangre de un donante sano elegido de modo aleatorio, como células efectoras;  
3) el ensayo se realiza según el siguiente protocolo:

- 30 i) las PBMC se aíslan utilizando procedimientos de centrifugación de densidad convencionales y se suspenden a  $5 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo celular RPMI;  
ii) las células diana se cultivan mediante métodos de cultivo tisular convencionales, se recolectan en la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor que 90 %, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios de  $^{51}\text{Cr}$ , se lavan dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de  $10^5$  células/ml;  
35 iii) se trasladan 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior a cada uno de los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos;  
iv) el anticuerpo se diluye en serie desde 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpos resultantes a las células diana en una placa de microvaloración de 96 pocillos, ensayando por triplicado diversas concentraciones de anticuerpos que abarquen el intervalo de concentración completo anterior;  
40 v) para los controles de liberación máxima (LM), 3 pocillos más en la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (en v/v) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv anterior);  
45 vi) para los controles de liberación espontánea (LE), 3 pocillos más en la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de un medio de cultivo celular RPMI, en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv anterior);  
vii) la placa de 96 pocillos entonces se centrifuga a  $50 \times g$  durante 1 minuto y se incuba durante una hora a  $4^\circ\text{C}$ ;  
50 viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para producir una proporción de células efectoras:diana de 25:1, y las placas se colocan en un incubador bajo una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas;  
ix) el sobrenadante exento de células de cada pocillo se recolecta y se cuantifica la radiactividad experimentalmente liberada (RE) utilizando un contador gamma;  
55 x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo según la fórmula  $(\text{RE}-\text{LM})/(\text{LM}-\text{LE}) \times 100$ , en la que RE es la radiactividad media cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, LM es la radiactividad media cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles de LM (véase el punto v anterior), y LE es la radiactividad media cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles LE (véase el punto vi anterior);

- 60 4) una "mayor ADCC" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo ensayado anteriormente y/o una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo ensayado anteriormente. El aumento en la ADCC se relaciona con la ADCC, medida en el anterior ensayo, mediada por el mismo anticuerpo, producido en el mismo tipo de células hospedantes, utilizando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y
- 65

conservación, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no ha sido producido por células hospedantes modificadas genéticamente para que sobreexpresen la glicosiltransferasa GnTIII.

Tal como se emplea en la presente, la expresión anticuerpo anti-CD20 significa un anticuerpo que reconoce de modo específico una fosfoproteína no glicosilada de la superficie celular de 35.000 Dalton, denominada de forma característica antígeno de diferenciación restringido de linfocitos B humanos Bp35, denominado habitualmente CD20.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la modificación genética de células productoras de anticuerpos para que expresen un nuevo polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) o, como alternativa, actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT"), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi, produce anticuerpos con mayor afinidad de unión al receptor de Fc y mayor función efectora. Como alternativa, pueden obtenerse anticuerpos con mayor función efectora y/o mayor unión al receptor de Fc modificando genéticamente células productoras de anticuerpos para que aumenten la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad catalítica  $\alpha$ -manosidasa II. En realizaciones preferidas, los constructos de fusión que tienen actividad GnTIII o GalT se coexpresan con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican ManII o GnTII.

Por consiguiente, en una realización la presente divulgación se dirige a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. En una realización adicional, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de GalT.

Preferiblemente, el ácido nucleico aislado tiene la secuencia de nucleótidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 14. En otra realización preferida, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III y el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI). Preferentemente, el ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la FIG. 25 y en la SEC ID N°: 12. Como alternativa, puede usarse el dominio de localización en Golgi de otro polipéptido residente en Golgi. En otra realización preferida, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, el dominio de localización de manosidasa I y el dominio de localización de  $\alpha$ 1-6 fucosiltransferasa de núcleo.

En otra realización preferida, la presente divulgación se dirige a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 15 o en FIG. 25 y SEC ID N°: 13. La presente divulgación también incluye un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una sonda de hibridación cuya secuencia de nucleótidos consiste en la secuencia de nucleótidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 14 o en FIG. 25 y SEC ID N°: 12. La divulgación se dirige además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 14 o en FIG. 25 y SEC ID N°: 12. En otra realización, la divulgación se dirige a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 15 o en FIG. 25 y SEC ID N°: 13. La invención también incluye un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que aparece en FIG. 24 y SEC ID N°: 15 o en FIG. 25 y SEC ID N°: 13, con sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, tales como los descritos anteriormente.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III o, como alternativa, actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT"), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de fusión de la divulgación comprenden el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III. En una realización particularmente preferida, los polipéptidos de fusión comprenden además el dominio de localización en Golgi de manosidasa II o de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI). En una realización alternativa, el dominio de localización en Golgi se selecciona del grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha$ 1-6 fucosiltransferasa de núcleo. Los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden prepararse cultivando las células hospedantes de la presente invención en un medio bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de fusión, y recuperando dicho polipéptido de fusión a partir del cultivo resultante.

La presente divulgación se dirige además a un método para modificar el perfil de glicosilación de un polipéptido producido por una célula hospedante, que comprende introducir en dicha célula hospedante un ácido nucleico o un vector de la divulgación. Preferiblemente, el polipéptido modificado genéticamente es IgG, o un fragmento de ésta que

comprende la región Fc. Lo más preferiblemente, el polipéptido es IgG1, o un fragmento de ésta que comprende la región Fc. En otra realización preferida, el polipéptido modificado genéticamente es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

La presente divulgación se dirige también a células hospedantes que comprenden los ácidos nucleicos y los vectores de expresión de la invención. En una realización, la presente divulgación se dirige a una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III o, como alternativa, actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT"), en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en la que dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización preferida, el polipéptido producido por dicha célula hospedante es IgG o un fragmento de ésta. Lo más preferiblemente, el polipéptido producido por dicha célula hospedante es IgG1 o un fragmento de ésta. Como alternativa, el polipéptido producido por dicha célula hospedante es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una IgG humana, por ejemplo IgG1.

Los polipéptidos modificados genéticamente producidos por las células hospedantes de la invención muestran una mayor afinidad de unión al receptor Fc y/ una mayor función efectora como resultado de la modificación genética. Preferiblemente, la mayor afinidad de unión al receptor Fc es una mayor unión a un receptor activador Fc $\gamma$ , tal como el receptor Fc $\gamma$ RIIIa. La mayor función efectora es preferiblemente un aumento en uno o más de los siguientes: mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mayor fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), mayor secreción de citoquinas, mayor captación de antígenos mediada por el complejo inmunológico por células presentadoras de antígenos, mayor citotoxicidad celular mediada por Fc, mayor unión a células NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a células polimorfonucleares (PMN), mayor unión a monocitos, mayor reticulación de anticuerpos unidos a dianas, mayor señalización directa inductora de la apoptosis, mayor maduración de células dendríticas, y mayor cebado de células T.

En una realización particularmente preferida, la célula hospedante de la invención es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER.C6, o una célula de hibridoma, y el polipéptido producido por dicha célula hospedante es un anticuerpo anti-CD20, tal como IDEC-C2B8. En otra realización preferida, la célula hospedante es el anticuerpo monoclonal anti-EGFR humano quimérico C225.

Además de comprender un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de la divulgación, las células hospedantes de la divulgación pueden comprender además al menos un ácido nucleico transeccionado que codifica una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que conserva una región Fc funcional, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, el al menos un ácido nucleico transeccionado codifica un anticuerpo anti-CD20, el anticuerpo monoclonal anti-neuroblastoma humano quimérico chCE7, el anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de células renales humano quimérico chG250, el anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de mama, colon y pulmón humano quimérico ING-1, el anticuerpo monoclonal anti-antígeno 17-1A humano humanizado 3622W94, el anticuerpo anti-tumor colorrectal humano humanizado A33, el anticuerpo anti-melanoma humano dirigido contra el gangliósido GD3 R24, el anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de células escamosas humano quimérico SF-25, un anticuerpo anti-EGFR humano, un anticuerpo anti-EGFRvIII humano, un anticuerpo anti-PSMA humano, un anticuerpo anti-PSCA humano, un anticuerpo anti-CD22 humano, un anticuerpo anti-CD30 humano, un anticuerpo anti-TAG72, un anticuerpo anti-antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), un anticuerpo anti-gangliósido GD3, un anticuerpo anti-gangliósido GD2, un anticuerpo anti-gangliósido GM2, un anticuerpo anti-gangliósido humano, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-CD80, un anticuerpo anti-LeY, un anticuerpo anti-mucina, un anticuerpo anti-MUC18, un anticuerpo anti-CD33 humano, un anticuerpo anti-CD38 humano, un anticuerpo anti-CD40 humano, un anticuerpo anti-CD45 humano, un anticuerpo anti-CD52 humano, un anticuerpo anti-CD138 humano, un anticuerpo anti-variante de HLA-DR humano, un anticuerpo anti-EpCAM humano, un anticuerpo anti-CEA humano, un anticuerpo anti-MUC1 humano, un anticuerpo anti-proteína central de MUC1 humana, un anticuerpo anti-MUC1 aberrantemente glicosilado humano, un anticuerpo contra los variantes de fibronectina humana que contienen el dominio ED-B, o un anticuerpo anti-HER2/neu humano.

La presente divulgación también se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante que comprende (a) cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III o, como alternativa,  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa ("GalT"), bajo condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que conserva una región Fc funcional, y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII o, como alternativa, actividad GalT se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante; y (b) aislar dicho polipéptido. En una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi.

Preferiblemente, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II y el dominio de localización de  $\alpha 1-6$  fucosiltransferasa de núcleo. Los polipéptidos producidos mediante los métodos de la presente invención tienen mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora. Preferiblemente, la mayor función efectora es una o más de las siguientes: mayor citotoxicidad celular mediada por Fc (incluyendo mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), mayor fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), mayor secreción de citoquinas, mayor captación de antígenos mediada por el complejo inmunológico por células presentadoras de antígenos, mayor unión a células NK, mayor unión a macrófagos, mayor unión a monocitos, mayor unión a células polimorfonucleares, mayor señalización directa inductora de la apoptosis, mayor reticulación de anticuerpos unidos a dianas, mayor maduración de células dendríticas, o mayor cebado de células T. La mayor afinidad de unión al receptor de Fc es preferiblemente una mayor unión a receptores activadores de Fc, tales como Fc $\gamma$ R1IIa.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un polipéptido producido mediante los métodos de la invención que tiene una mayor proporción de oligosacáridos bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. En otra realización, el polipéptido producido por los métodos de la invención tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de dicha modificación genética. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser de tipo híbrido o complejo. En una realización particularmente preferida, el polipéptido producido por las células hospedantes y los métodos de la invención tiene una mayor proporción de oligosacáridos bisectados no fucosilados en la región Fc. Los oligosacáridos bisectados no fucosilados pueden ser híbridos o complejos. De modo específico, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para producir polipéptidos en los que al menos 15 %, más preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 35 %, más preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 45 %, más preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 55 %, más preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son no fucosilados. Los métodos de la presente invención también pueden utilizarse para producir polipéptidos en los que al menos 15 %, más preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 35 %, más preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 45 %, más preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 55 %, más preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son bisectados. Además, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para producir polipéptidos en los que al menos 15 %, más preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 35 %, más preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 45 %, más preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 55 %, más preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son bisectados y no fucosilados. Los métodos de la presente invención también pueden utilizarse para producir polipéptidos en los que al menos 15 %, más preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 35 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son híbridos, bisectados y no fucosilados.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un anticuerpo modificado genéticamente para tener función efectora aumentada y/o afinidad de unión a receptor de Fc aumentada, producido mediante los métodos de la invención. Preferentemente, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada), fagocitosis celular mediada por Fc aumentada (ADCP), secreción de citoquinas aumentada, captación de antígenos por células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmune aumentada, unión a células NK aumentada, unión a macrófagos aumentada, unión a monocitos aumentada, unión a células polimorfonucleadas aumentada, señalización directa que aumenta la apoptosis aumentada, reticulación aumentada de anticuerpos unidos a su diana, maduración de células dendríticas aumentada o cebado de linfocitos T aumentado. En una realización preferida, la afinidad de unión a receptor de Fc aumentada es unión aumentada a un receptor activante de Fc, más preferentemente Fc $\gamma$ R1IIa. La divulgación se dirige además a fragmentos de anticuerpo que contienen la región Fc y a proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. Dichos fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión muestran afinidad de unión a receptor de Fc aumentada y/o función efectora aumentada.

La presente divulgación se dirige además a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, a fragmentos de anticuerpo que mantienen la región Fc y a proteínas de fusión que tienen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación se dirige además al uso de dichas composiciones farmacéuticas en un método de tratamiento para el cáncer. Específicamente, la presente divulgación se dirige a un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

La presente divulgación también se dirige a una célula hospedante que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, en la que el polipéptido de fusión tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi; y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido tiene actividad manosidasa II (Man II). En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido que tiene actividad manosidasa II están en el mismo vector o en diferentes vectores de expresión. En otra realización preferida, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GnT III. En una realización preferida adicional, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de Man II, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, de manosidasa I o de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo. En una realización preferida adicional, la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto y una célula vegetal. Preferiblemente, la célula hospedante es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula YO de mieloma, una célula P3X63 de mieloma de ratón, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma.

La divulgación proporciona además una célula hospedante que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi, un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido tiene actividad manosidasa II (Man II), y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido tiene actividad  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT II). En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad manosidasa II y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnT II están en el mismo vector o en diferentes vectores de expresión. También se prefiere que la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión esté en un vector de expresión, y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad Man II y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnT II estén en el mismo vector de expresión. También se prefiere que la molécula de ácido nucleico que codifica una ManII esté en un vector de expresión, y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnT II estén sobre el mismo vector de expresión. En otra realización, la GnT II está en un vector de expresión, y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad Man II están sobre el mismo vector de expresión.

En una divulgación adicional, la invención se dirige a una célula hospedante que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión tiene actividad de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (GalT) y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi; y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido tiene actividad de manosidasa II (Man II). En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de manosidasa II están en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados. Preferiblemente, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GalT. En una realización adicional, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de Man II, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, de manosidasa I o de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo. En una realización preferida, la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal. Preferentemente, la célula hospedante es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula YO de mieloma, una célula P3X63 de mieloma de ratón, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma.

En una divulgación adicional, la invención se dirige a una célula hospedante que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión tiene actividad de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (GalT) y comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi; y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido tiene actividad de manosidasa II (Man II); y un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido tiene actividad de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (TnT II). Preferiblemente, cada ácido nucleico está en el mismo vector de expresión. En una realización separada, cada molécula de ácido nucleico está en un vector separado. La divulgación proporciona además que la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión esté en un vector de expresión, y que la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II estén en el mismo vector de expresión. La divulgación también proporciona que la molécula de ácido nucleico que codifica una ManII esté en un vector de expresión, y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que

codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II estén en el mismo vector de expresión. La divulgación también proporciona que la molécula de ácido nucleico que codifica la GnT II esté en un vector de expresión, y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión y la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II estén en el mismo vector de expresión. En una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GaIT. En una realización preferida adicional, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de Man II, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, de manosidasa I o de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo.

La invención proporciona además una célula hospedante de mamífero o de levadura modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnT III y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que el polipéptido producido por la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

La invención también proporciona una célula hospedante de mamífero o de levadura modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnT III, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene Man II y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que el polipéptido producido por la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

La presente divulgación proporciona además una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GaIT y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que el polipéptido producido por la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

En una realización separada, la presente divulgación también proporciona una célula hospedante modificada genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GaIT, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene Man II y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por la célula hospedante, en el que el polipéptido producido por la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. Preferiblemente, el polipéptido producido por la célula hospedante muestra afinidad de unión a receptor de Fc aumentada como consecuencia de la modificación genética. En una realización preferida adicionalmente, el polipéptido producido por la célula hospedante muestra función efectora aumentada como consecuencia de la modificación genética. Preferiblemente, la función efectora aumentada es una o más de citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, unión a células NK aumentada, unión a macrófagos aumentada, unión a células polimorfonucleares aumentada, unión a monocitos aumentada, apoptosis inducida por señalización directa aumentada, maduración de células dendríticas aumentada y/o cebado de linfocitos T aumentado.

En una realización adicional, la invención se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante de mamífero o levadura que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GnT III y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que el polipéptido de fusión se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido producido por la célula hospedante; y aislar el polipéptido. Preferiblemente, la célula hospedante se modifica adicionalmente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II. En una realización preferida adicionalmente, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GnT II. En una realización preferida adicional, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Preferiblemente, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, de manosidasa I o de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo. Preferentemente, el polipéptido tiene función efectora aumentada como consecuencia de la modificación genética anterior.

La divulgación se dirige además a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante, que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de GaIT y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de Man II en condiciones que permitan la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste



en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que el polipéptido de fusión se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido producido por la célula hospedante; y aislar el polipéptido. En una realización adicional, la célula hospedante se modifica adicionalmente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnT II. Preferiblemente, el polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GalT. También se prefiere que el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, de manosidasa I o de  $\alpha 1$ -6 fucosiltransferasa de núcleo. Preferiblemente, el polipéptido tiene función efectora aumentada como consecuencia de la modificación genética anterior. Específicamente, en una realización preferida, el polipéptido producido por la célula hospedante tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisectados y no fucosilados en la región Fc del polipéptido. Preferiblemente, los oligosacáridos bisectados y no fucosilados son híbridos. Aún más preferiblemente, los oligosacáridos bisectados y no fucosilados son complejos. En una realización preferida, al menos de aproximadamente un 10 % a un 95 % de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son bisectados y no fucosilados. Se prefiere especialmente que aproximadamente el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de los oligosacáridos en la región Fc de los polipéptidos glucomodificados genéticamente de la presente invención sean bisectados y no fucosilados.

En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona que los anticuerpos modificados genéticamente de acuerdo con los métodos de la presente divulgación tengan función efectora aumentada.

En una realización adicional, la divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos modificados genéticamente de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona además un método para el tratamiento de tumores cancerosos que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación a un paciente que lo necesite.

La divulgación se dirige además a un método para producir un polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada en una célula hospedante, que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica GalT y al menos un ácido nucleico que codifica Man II en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que incluye la región Fc de una inmunoglobulina, en el que el nivel de expresión de uno o ambos de GalT o Man II es suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido producido por la célula hospedante y en el que el polipéptido tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada como resultado de la modificación genética; y aislar el polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada. En una realización preferida adicional, el nivel de expresión de GalT produce una molécula de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye la región Fc de una inmunoglobulina que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

La divulgación se dirige además a un método para producir un polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada en una célula hospedante que comprende cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica GalT y al menos un ácido nucleico que codifica Man II en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que incluye la región Fc de una inmunoglobulina, en el que el nivel de expresión de uno o ambos de GalT o Man II es suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido producido por la célula hospedante y en el que el polipéptido tiene citotoxicidad celular mediada por Fc como resultado de la modificación genética; y aislar el polipéptido que tiene citotoxicidad celular mediada por Fc. En una realización preferida, la célula hospedante anterior comprende al menos un ácido nucleico que codifica GnT III, en el que la GnT III se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido producido por la célula hospedante y en el que el polipéptido tiene citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada como resultado de la modificación genética. Preferiblemente, el nivel de expresión de uno o más de GalT, Man II o GnT III es suficiente para formar oligosacáridos bisectados en la región Fc del polipéptido. Aún más preferiblemente, la proporción de oligosacáridos bisectados en la región Fc a oligosacáridos totales en la región Fc es de al menos aproximadamente un 25, 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 por ciento. Preferiblemente, la proporción de oligosacáridos bisectados en la región Fc a oligosacáridos totales en la región Fc es de al menos aproximadamente un 45 por ciento. En una realización preferida, los oligosacáridos bisectados son complejos o híbridos. Preferiblemente, la célula hospedante es una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal. Aún más preferiblemente, la célula hospedante es una célula vegetal.

En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para producir un polipéptido en una célula hospedante, que comprende:

- a. cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que

codifica un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -manosidasa II en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -manosidasa II se expresa en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante; y b. asilar dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante.

La presente divulgación también se dirige a polipéptidos, particularmente anticuerpos, que tienen función efectora aumentada y/o unión a receptor de Fc aumentada como resultado de dichos oligosacáridos modificados genéticamente así como a su uso en composiciones terapéuticas para tratar trastornos, particularmente tumores.

Identificación y generación de ácidos nucleicos que codifican una proteína para la cual se desea una modificación genética en el patrón de glicosilación

La presente invención proporciona métodos para la generación de sistemas de células hospedantes para la producción de glicofomas de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que contienen la región Fc, y proteínas de fusión con una región equivalente a la región Fc, que tienen mayor afinidad de unión al receptor de Fc, preferiblemente receptores activadores de Fc, y/o que tienen mayores funciones efectoras, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la identificación de epítopos diana y la generación de anticuerpos con valor terapéutico potencial, para los cuales se desea una modificación genética en el patrón de glicosilación, y el aislamiento de su respectiva secuencia de ácido nucleico codificadora está dentro del alcance de la divulgación.

Pueden utilizarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos contra epítopos diana de interés. Estos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por un banco de expresión de ScFv, Fab, VH, IgG. Estos anticuerpos pueden ser útiles, por ejemplo, como agentes de diagnóstico o terapéuticos. Como agentes terapéuticos resultan de interés especialmente preferido los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que compiten por la unión con un ligando, sustrato o molécula adaptadora.

Para la producción de anticuerpos, se inmunizan diversos animales hospedantes mediante una inyección con la proteína diana de interés que incluyen, pero no se limitan a conejos, ratones, ratas, etc. En los animales pueden generarse anticuerpos policlonales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sb) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Pueden emplearse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedante, que incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, saponina, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los animales se inmunizan contra el antígeno, contra conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 g o 5 g de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o del conjugado en adyuvante de Freund mediante una inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después los animales se sangran y el suero se ensaya para valorar los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que la valoración alcanza un valor de meseta. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas.

Los anticuerpos monoclonales para la diana de interés pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridoma originariamente descrita por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975), la técnica de hibridoma de células B humano (Kosbor et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:2026-2030 (1983)), y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77-96 (Alan R. Liss, Inc., 1985)). Además pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314:452-454 (1985) cortando y empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con la especificidad de antígeno apropiada, junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con la actividad biológica apropiada. Estas técnicas también pueden utilizarse para producir anticuerpos quiméricos que comprenden una molécula de anticuerpo de otros mamíferos. Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EEUU n° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios con la especificidad deseada. La divulgación también se dirige a anticuerpos humanizados que se han glicomodificado genéticamente según los métodos de la presente divulgación. Las técnicas para generar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la patente de EEUU n° 6.180.320 de Queen et al.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica de la proteína diana de interés mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, pero no se limitan a fragmentos  $F(ab')_2$  que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab que pueden

generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Como alternativa, pueden construirse bancos de expresión de Fab (Huse et al., Science, 246: 1275-1281 (1989)) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por la proteína diana de interés.

- 5 Cuando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ha sido identificado, para el cual se desea una modificación genética en el patrón de glicosilación, se identifica la secuencia de ácido nucleico codificadora y se aísla utilizando técnicas conocidas en la técnica.

a. Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con un patrón de glicosilación alterado.

10 La presente invención proporciona sistemas de expresión de células hospedantes de mamífero y levadura para la generación de proteínas que tengan patrones de glicosilación modificados genéticamente. En particular, la presente invención proporciona sistemas de células hospedantes para la generación de glicoformas de proteínas que tengan un mayor valor terapéutico. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona sistemas de expresión de células  
15 hospedantes seleccionadas o modificadas genéticamente para que expresen, por ejemplo, un polipéptido de fusión que tenga actividad  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprenda el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. De modo específico, dichos sistemas de expresión de células hospedantes pueden modificarse genéticamente para que comprendan una molécula de ácido nucleico recombinante que codifique dicho polipéptido de fusión, unida operativamente a un sistema promotor constitutivo o regulado.

20 En una realización específica, la presente divulgación proporciona una célula hospedante que se ha modificado genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En un aspecto, la célula hospedante se modifica genéticamente con una  
25 molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

30 En general, puede utilizarse cualquier tipo de línea celular de mamífero o levadura cultivada como punto de partida para modificar genéticamente las líneas celulares hospedantes de la presente invención. En una realización preferida, se emplean células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura como línea celular de punto de partida para generar las células hospedantes modificadas genéticamente de la invención (véase Ma, J.K.-C., et al., Natui-e Genetics, 4: 794-805 (octubre 2003) y las referencias citadas allí).

35 Se contempla que la divulgación incluya cualquier célula hospedante modificada genéticamente que exprese un polipéptido de fusión que tenga actividad  $\beta(1,4)$ -N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprenda el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, como se define en la presente.

40 Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, como alternativa, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero no se limitan a un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema  
45 de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por la temperatura, y un sistema de expresión inducible por metalotioneína metálica. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprenden el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo están incluidos dentro del sistema de células hospedantes, algunos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo,  
50 mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Se considera que el nivel de expresión máximo es el nivel más alto posible de expresión del polipéptido de fusión estable que no tenga un efecto significativo adverso sobre la velocidad de crecimiento celular, y se determinará utilizando la experimentación habitual. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos conocidos en general en la técnica, incluyendo el análisis de la transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para el polipéptido que tiene actividad GnTIII, o un anticuerpo específico para un marcador peptídico condensado al polipéptido que tiene actividad GnTIII, un análisis de  
55 la transferencia Northern utilizando una sonda de ácido nucleico específica para el gen que codifica el polipéptido que tiene actividad GnTIII o una sonda de ácido nucleico específica para un ácido nucleico que codifica un marcador peptídico condensado al polipéptido que tiene actividad GnTIII, o la medida de la actividad GnTIII. Como alternativa, puede emplearse una lectina que se una a los productos biosintéticos de la GnTIII, por ejemplo, lectina E<sub>4</sub>-PHA. Como  
60 alternativa, puede utilizarse un ensayo funcional que mida la mayor unión al receptor de Fc o la mayor función efectora mediada por los anticuerpos producidos por las células modificadas genéticamente con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII. También como alternativa, el ácido nucleico puede unirse operablemente a un gen indicador; los niveles de expresión del polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ - N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo se  
65 determinan midiendo una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen indicador. El gen indicador puede transcribirse junto con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de fusión como una única

molécula de ARNm; sus respectivas secuencias codificadoras pueden estar unidas mediante un sitio de entrada a ribosomas interno (IRES) o mediante un potenciador de la traducción independiente de casquete (CITE). El gen indicador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, de manera que se forma una única cadena polipeptídica. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de la presente divulgación pueden estar operativamente unidos al gen indicador bajo el control de un único promotor, de forma que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y el gen indicador se transcriben en una molécula de ARN que se corta y empalma de modo alternativo en dos moléculas de ARN mensajero (ARNm) distintas; uno de los ARNm resultantes se traduce en la proteína indicadora, y el otro se traduce en el polipéptido de fusión.

Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo se expresan, pueden disponerse de tal forma que se transcriben como una o como varias moléculas de ARNm. Si se transcriben como una única molécula de ARNm, sus respectivas secuencias codificadoras pueden estar unidas mediante un sitio de entrada a ribosomas interno (IRES) o mediante un potenciador de la traducción independiente de casquete (CITE). Pueden transcribirse a partir de un único promotor en una molécula de ARN, que se corta y empalma de modo alternativo en varias moléculas de ARN mensajero (ARNm) distintas, que entonces se traducen cada una en sus respectivos polipéptidos de fusión codificados.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona sistemas de expresión de células hospedantes de mamífero o de levadura para la generación de anticuerpos terapéuticos con una mayor afinidad de unión al receptor de Fc, en particular unión a receptores activadores de Fc, y una mayor función efectora, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En una realización de la divulgación, los sistemas de expresión de células hospedantes se han modificado genéticamente y/o seleccionado para que expresen ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo para el cual se desea la producción de glicoformas alteradas, junto con al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En una realización, el sistema de células hospedantes se transfecta con al menos un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de fusión. De forma característica, las células transfectadas se seleccionan para identificar y aislar clones que expresen de modo estable el polipéptido de fusión de la invención.

Puede utilizarse cualquier tipo de línea celular cultivada como punto de partida para modificar genéticamente las líneas celulares hospedantes de la presente invención. En una realización preferida, pueden utilizarse células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero o células de levadura. De forma característica, estas líneas celulares se modifican para que comprendan además al menos un ácido nucleico transfectado que codifica una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc de una inmunoglobulina, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. De forma característica, estas líneas celulares productoras de anticuerpos se derivan de clones que producen y segregan el anticuerpo a altas productividades específicas en el intervalo entre 20 y 120 pg/(célula.día). En una realización alternativa, se emplea una línea celular de hibridoma que expresa un anticuerpo concreto de interés como línea celular de partida para generar las células hospedantes modificadas genéticamente de la invención.

En una realización, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o un polipéptido de fusión de Fc se clonan en vectores de expresión de anticuerpos y después se transfectan en las células hospedantes y se seleccionan los clones celulares con productividad de anticuerpos específicos alta y estable. Estos clones seleccionados entonces se transfectan con vectores de expresión de glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas que contienen los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, (a) un polipéptido de fusión con actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), o (b) un polipéptido de fusión con actividad  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT), o (c) un polipéptido con actividad Golgi alfa-manosidasa II (ManII), o (d) un polipéptido de fusión con actividad GnTIII y otro polipéptido con actividad ManII, o (e) un polipéptido de fusión con actividad GalT y otro polipéptido con actividad ManII. Los clones entonces se seleccionan para la expresión estable de genes que codifican anticuerpos a niveles que conducen a altas productividades de anticuerpos específicos, y con la expresión estable de los genes de glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas a unos niveles de expresión que conducen a la modificación genética del patrón de glicosilación de la región Fc, incluyendo un aumento en la fracción de oligosacáridos no fucosilados que pueden estar bisectados o no bisectados, y que además pueden ser de tipo complejo o híbrido, que está asociado con un aumento en la unión al receptor de Fc, en particular un aumento en la afinidad de unión a Fc-Fc $\gamma$ RIII, y un aumento en las funciones efectoras mediadas por el receptor de Fc incluyendo, pero sin limitarse a la citotoxicidad celular dependiente de Fc. Los métodos de selección se describen a continuación.

En otra realización, el orden de las dos transfecciones descritas anteriormente, es decir, la transfección de vectores de expresión de anticuerpos y la transfección de vectores de expresión de glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas, se invierte, es decir, las células hospedantes primero se transfectan con los vectores de expresión de glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas, y después con los vectores de expresión de anticuerpos. En esta estrategia, los clones de la primera transfección pueden seleccionarse para unos niveles adecuados de expresión

estable de los genes de glicosiltransferasa mediante cualquiera de los métodos descritos a continuación o, como alternativa, transfectando de modo transitorio duplicados de dichos clones con vectores de expresión de anticuerpos y después aplicando los métodos de selección descritos a continuación para identificar los clones con un nivel de expresión estable de los genes de glicosiltransferasa a unos niveles que conducen a una modificación genética del patrón de glicosilación de la región de Fc y a un aumento en el receptor de Fc, incluyendo los receptores de FcγRIII, la afinidad de unión y un aumento en las funciones efectoras mediadas por Fc, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de Fc.

En otra realización, los genes que codifican anticuerpos y los genes de glicosiltransferasa se transfectan juntos en una única etapa de transfección, en un único vector de expresión o en vectores separados.

De forma característica, al menos un ácido nucleico en el sistema de células hospedantes codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) o, como alternativa, actividad β(1,4)-galactosiltransferasa, y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo o, como alternativa, codifica un polipéptido con actividad Golgi α-manosidasa II.

Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión de la divulgación pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, como alternativa, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero no se limitan a un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por la temperatura, y un sistema de expresión inducible por metalotioneína metálica. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican un polipéptido de fusión que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo están incluidos dentro del sistema de células hospedantes, algunos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Se considera que el nivel de expresión máximo es el nivel más alto posible de expresión del polipéptido de fusión estable que no tenga un efecto significativo adverso sobre la velocidad de crecimiento celular, y se determinará utilizando la experimentación habitual. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos conocidos en general en la técnica, incluyendo el análisis de la transferencia Western utilizando, por ejemplo, un anticuerpo específico para el polipéptido que tiene actividad GnTIII, o un anticuerpo específico para un marcador peptídico condensado al polipéptido que tiene actividad GnTIII, un análisis de la transferencia Northern que utiliza una sonda de ácido nucleico específica, por ejemplo, para el gen que codifica el polipéptido que tiene actividad GnTIII o una sonda de ácido nucleico específica para un ácido nucleico que codifica un marcador peptídico condensado al polipéptido que tiene actividad GnTIII, o la medida de la actividad enzimática de GnTIII. Como alternativa, puede emplearse una lectina que se una a los productos biosintéticos de la GnTIII, por ejemplo, lectina E4-PHA. Como alternativa, puede utilizarse un ensayo funcional que mida la mayor unión al receptor de Fc o la mayor función efectora mediada por los anticuerpos producidos por las células modificadas genéticamente con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII. También como alternativa, el ácido nucleico puede unirse operablemente a un gen indicador; los niveles de expresión del polipéptido de fusión de la divulgación se determinan midiendo una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen indicador. El gen indicador puede transcribirse junto con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican dicha glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas como una única molécula de ARNm; sus respectivas secuencias codificadoras pueden estar unidas mediante un sitio de entrada a ribosomas interno (IRES) o mediante un potenciador de la traducción independiente de casquete (CITE). El gen indicador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, de manera que se forma una única cadena polipeptídica. El ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión puede estar operativamente unido al gen indicador bajo el control de un único promotor, de forma que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la divulgación y el gen indicador se transcriben en una molécula de ARN que se corta y empalma de modo alternativo en dos moléculas de ARN mensajero (ARNm) distintas; uno de los ARNm resultantes se traduce en la proteína indicadora, y el otro se traduce en dicho polipéptido de fusión.

Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican un polipéptido de fusión que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo se expresan, pueden disponerse de tal forma que se transcriban como una o como varias moléculas de ARNm. Si se transcriben como una única molécula de ARNm, sus respectivas secuencias codificadoras pueden estar unidas mediante un sitio de entrada a ribosomas interno (IRES) o mediante un potenciador de la traducción independiente de casquete (CITE). Pueden transcribirse a partir de un único promotor en una molécula de ARN, que se corta y empalma de modo alternativo en varias moléculas de ARN mensajero (ARNm) distintas, que entonces se traducen cada una en sus respectivos polipéptidos de fusión codificados.

#### i. Sistemas de expresión

Pueden utilizarse métodos muy conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora de un polipéptido de fusión que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, junto con señales de control transcripcionales/traduccionales

apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación in vivo/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Puede utilizarse diversos sistemas de vectores de expresión- hospedante para expresar la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la presente divulgación. Preferiblemente, se emplean células de mamífero como sistemas de células hospedantes transfectadas con vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN cosmídico recombinante que contengan la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión. Lo más preferiblemente, se emplean células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales como sistema de células hospedantes. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en las siguientes referencias bibliográficas y las referencias citadas en ellas: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.*, 71(4):266-273 (2000-2001), en Werner et al., *Arzneimittelforschung/Drug Res.*, 48(8):870-880 (1998), en Andersen y Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.*, 13:117-123 (2002), en Chadd y Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.*, 12:188-194 (2001), y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.*, 12: 450-454 (2001). Tal como se describe en el presente documento, pueden contemplarse otros sistemas de células hospedantes eucariotas, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la invención; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la invención; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la invención; o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, adenovirus, virus de vaccinia), incluyendo células modificadas genéticamente para que contengan múltiples copias del ADN que codifica la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la invención amplificado de modo estable (CHO/dhfr) o amplificado de modo inestable en cromosomas diminutos dobles (por ejemplo, líneas celulares murinas).

Para los métodos de esta invención, la expresión estable se prefiere en general frente a la expresión transitoria porque logra, de forma característica, resultados más reproducibles y también es más susceptible a una producción a gran escala, es decir, la producción de los anticuerpos glicomodificados genéticamente de la presente divulgación en líneas celulares de escala de producción. En lugar de emplear vectores de expresión que contengan orígenes de la replicación víricos, las células hospedantes pueden transformarse con los respectivos ácidos nucleicos codificadores controlados por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción de ADN extraño, las células modificadas genéticamente pueden dejarse en cultivo durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después 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 tengan integrado de modo estable el plásmido en sus cromosomas y se cultivan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

Puede utilizarse una serie de sistemas de selección incluyendo, pero sin limitarse a los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler et al., *Cell*, 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026 (1962)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell*, 22:817 (1980)), que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia a antimetabolitos como base para la selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567 (1989); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981)); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., *Genre*, 30:147 (1984)). En fechas recientes se han descrito otros genes seleccionables, en concreto trpB, que permite a las células utilizar el indol en lugar del triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8047 (1988)); el sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: *Currant Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

ii. Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que tiene un patrón de glicosilación modificado

Las células hospedantes que contienen la secuencia codificadora y que expresan los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse mediante al menos cuatro estrategias generales: (a) hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones de genes "marcadores"; (c) la evaluación del nivel de transcripción, medido mediante la expresión de los respectivos transcritos de ARNm en la célula hospedante; y (d) la detección del producto génico, medido mediante un inmunoensayo o mediante su actividad biológica.

En la primera estrategia, la presencia de la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la divulgación insertados en el vector de expresión puede detectarse mediante hibridación de ADN- ADN o ADN-ARN utilizando sondas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las respectivas secuencias codificadoras, respectivamente, o a sus porciones o derivados.

En la segunda estrategia, el sistema de hospedante/vector de expresión recombinante puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o la ausencia de ciertas funciones de genes "marcadores" (por ejemplo, actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia al metotrexato, transformación de fenotipo, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la divulgación se insertan dentro de la secuencia de un gen marcador del vector, los recombinantes que contengan las respectivas secuencias codificadoras pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con las secuencias codificadoras bajo el control del mismo promotor o de un promotor diferente al empleado para controlar la expresión de las secuencias codificadoras. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o la selección indica la expresión de la secuencia codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión.

En la tercera estrategia, puede evaluarse la actividad transcripcional para la región codificadora de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la divulgación mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse ARN y analizarse mediante una transferencia Northern utilizando una sonda homóloga a las secuencias codificadoras de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión de la divulgación, o porciones concretas de éstas. Como alternativa, pueden extraerse los ácidos nucleicos totales de la célula hospedante y ensayarse para la hibridación con dichas sondas.

En la cuarta estrategia, puede evaluarse de modo inmunológico la expresión de los productos proteicos de la proteína de interés y la secuencia codificadora del polipéptido de fusión que tiene actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, por ejemplo mediante transferencias Western, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas y similares. Sin embargo, el ensayo principal para evaluar el éxito del sistema de expresión implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

b. Generación y uso de proteínas y de fragmentos de proteínas que tienen patrones de glicosilación alterados

i. Generación y uso de anticuerpos que tienen mayor función efectora que incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

En realizaciones preferidas, la presente divulgación proporciona glicoformas de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen mayor unión al receptor de Fc y/o función efectora, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En fechas recientes, ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales (mAb) no conjugados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han producido resultados alentadores (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm., 12: 223-225 (1997); Deo et al., Immunology Today, 18: 127 (1997)). Se ha aprobado una IgG1 quimérica no conjugada para el linfoma no hodgkiniano de células B folicular o de bajo grado (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm., 12: 223-225 (1997)), mientras que otro mAb no conjugado, una IgG1 humanizada dirigida a tumores de mama sólidos, ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III (Deo et al., Immunology Today, 18:127 (1997)). Los antígenos de estos dos mAb son expresados en alto nivel en sus respectivas células tumorales, y los anticuerpos median en la destrucción de tumores potentes a través de células efectoras in vitro e in vivo. Por contraste, muchos otros mAb no conjugados con finas especificidades tumorales no pueden disparar funciones efectoras de potencia suficiente para ser clínicamente útiles (Frost et al., Cancer, 80:317-333 (1997); Surfus et al., J. Immunother., 19:184-191 (1996)). Para algunos de estos mAb más débiles se está ensayando en la actualidad la terapia de citoquinas adjuntas. La adición de citoquinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentando la actividad y el número de los linfocitos en la circulación (Frost et al., Cancer, 80:317-333 (1997); Surfus et al., J. Immunother., 19:184-191 (1996)). La ADCC, un ataque lítico a las células diana de anticuerpos, se dispara tras la unión de receptores de leucocitos a la región constante (Fc) de anticuerpos (Deo et al., Immunology Today, 18:127 (1997)).

Una estrategia diferente, pero complementaria, para aumentar la actividad ADCC de IgG1 no conjugadas es modificar genéticamente la región Fc del anticuerpo. Estudios de modificación genética de proteínas han demostrado que los Fc $\gamma$ R interaccionan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG (Lund et al., J. Immunol., 157:4963-4969 (1996)). Sin embargo, la unión a Fc $\gamma$ R también requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn297 conservada en la región CH2 (Lund et al., J. Immunol., 157:4963-4969 (1996); Wright y Morrison, Trends Biotech., 15:26-31 (1997)), lo cual sugiere que el oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una confirmación del polipéptido CH2 activa. Por tanto, la modificación genética de la estructura del oligosacárido puede explorarse como un medio para aumentar la afinidad de la interacción.

Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos N-enlazados en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, un anticuerpo es producido como una población de glicoformas que comparten el mismo esqueleto polipeptídico pero que tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos que normalmente se encuentran en la región Fc de la IgG sérica son de tipo complejo biantenarico (Wormald et al., *Biochemistry*, 36:130-138 (1997)), con un bajo nivel de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc), y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación del núcleo. Algunos estudios sugieren que la estructura de carbohidratos mínima requerida para la unión a FcγR se encuentra dentro del núcleo de oligosacáridos (Lund et al., *J. Immunol.*, 157:4963-4969 (1996)).

Las líneas celulares derivadas de ratón o de hámster que se emplean en la industria y en el mundo académico para la producción de mAb terapéuticos no conjugados normalmente unen los determinantes de oligosacáridos requeridos en sitios de Fc. Sin embargo, las IgG expresadas en estas líneas celulares carecen del GlcNAc bisectante que se encuentra en bajas cantidades en las IgG séricas (Lifely et al., *Glycobiology*, 318:813-822 (1995)). Por contraste, en fechas recientes se ha observado que una IgG1 humanizada producida en mieloma de rata (CAMPATH-1H) porta un GlcNAc bisectante en algunas de sus glicoformas (Lifely et al., *Glycobiology*, 318:813-822 (1995)). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzó una actividad ADCC máxima in vitro similar a los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares convencionales, pero a concentraciones de anticuerpo significativamente menores.

El antígeno CAMPATH normalmente está presente a altos niveles sobre células de linfoma, y este mAb quimérico tiene una alta actividad ADCC en ausencia de un GlcNAc bisectante (Lifely et al., *Glycobiology*, 318:813-822 (1995)). En la vía de glicosilación N-enlazada, un GlcNAc bisectante es añadido por la enzima β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) (Schachter, *Biochem. Cell Biol.*, 64:163-181 (1986)).

Los estudios previos utilizaban una única línea de células CHO productora de anticuerpos, que previamente se había modificado genéticamente para que expresase, de una manera regulada externamente, diferentes niveles de una enzima del gen GnTIII clonado (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.*, 17:176-180 (1999)). Esta estrategia estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad ADCC del anticuerpo modificado genéticamente.

Otros anticuerpos de la divulgación que tienen mayor afinidad de unión al receptor de Fc y mayor función efectora incluyen, pero no se limitan a un anticuerpo monoclonal anti-neuroblastoma humano (chCE7) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de células renales humano quimérico (chG250) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado (por ejemplo, trastuzumab (HERCEPTIN)) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de mama, colon y pulmón humano quimérico (ING-1) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-antígeno 17-1A humano humanizado (3622W94) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo anti-tumor colorrectal humano humanizado (A33) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo anti-melanoma humano (R24) dirigido contra el gangliósido GD3 producido mediante los métodos de la invención, y un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de células escamosas humano quimérico (SF-25) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anticarcinoma de pulmón de células pequeñas humano (BEC2, ImClone Systems, Merck KgaA) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-linfoma no hodgkiniano humano (Bexxar (tositumomab), Coulter Pharmaceuticals), Oncolym (Techniclone, Alpha Therapeutic)) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas humano (C225, ImClone Systems) preparado mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma rectal y de colon humano (Panorex (edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome) preparado mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de ovario humano (Theragyn, Antisoma) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de leucemia mielógena aguda humano (SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-glioma maligno humano (Cotara, Techniclone, Cambridge Antibody Technology) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-linfoma no hodgkiniano de célula B humano (>DEC-Y2B8, IDEC Pharmaceuticals) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-tumores sólidos humanos (CEA-Cide, Immunomedics) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma colorrectal humano (Iodine 131-MN-14, Immunomedics) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma de ovario, riñón, mama y próstata humano (MDX-210, Medarex, Novartis) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma colorrectal y de páncreas humano (TTMA, Pharmacie & Upjohn) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma que expresa TAG-72 humano (MDX-220, Medarex) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-carcinoma que expresa EGFR humano (MDX-447) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF (Genentech) producido mediante los métodos de la invención, un anticuerpo monoclonal anti-melanoma maligno y carcinoma de mama, pulmón, próstata y páncreas humano (BrevaRex, AltaRex) producido mediante los métodos de la invención, y un anticuerpo monoclonal anti-leucemia mielógena aguda humana (Monoclonal Antibody Conjugate, Immune) producido mediante los métodos de la invención. Además, la divulgación se dirige a fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas.



ii. Generación y uso de proteínas de fusión que comprenden una región equivalente a una región Fc de una inmunoglobulina que estimula la citotoxicidad mediada por Fc

5 Tal como se analizó anteriormente, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la afinidad de unión al receptor de Fc y/o la función efectora de anticuerpos terapéuticos. Esto se logra modificando el patrón de glicosilación de la región Fc de dichos anticuerpos, en particular modificando genéticamente las células productoras de anticuerpos para que produzcan un polipéptido, por ejemplo con actividad de GnTIII o GalT, o actividad de ManII, que modifica los oligosacáridos unidos a la región Fc de dichos anticuerpos. Esta estrategia puede aplicarse para aumentar la citotoxicidad celular mediada por Fc contra células no deseables mediada por cualquier molécula que porte una región que sea equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, no sólo mediante anticuerpos terapéuticos, puesto que los cambios introducidos por la modificación genética de la glicosilación afectan sólo a la región Fc y, por tanto, sus interacciones con los receptores de Fc sobre la superficie de células efectoras implicadas en el mecanismo de ADCC. Las moléculas que contienen Fc a las que pueden aplicarse los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a (a) proteínas de fusión solubles compuestas de un dominio de proteína de transporte dirigido condensado con el N-terminal de una región Fc (Chamov y Ashkenazi, Trends Biotech., 14: 52 (1996), y (b) proteínas de fusión ancladas a la membrana plasmática compuestas de un dominio transmembrana de tipo II que se localiza en la membrana plasmática condensado con el N-terminal de una región Fc (Stabila, P.F., Nature Biotech., 16: 1357 (1998)).

20 En el caso de proteínas de fusión solubles (a), el dominio de transporte dirigido dirige la unión de la proteína de fusión a células no deseables, tales como células de cáncer, es decir, de una forma análoga a los anticuerpos terapéuticos. La aplicación del método descrito en la presente para potenciar la función efectora, incluyendo la actividad citotóxica celular mediada por Fc, mediada por estas moléculas, sería por tanto idéntica al método aplicado a los anticuerpos terapéuticos.

25 En el caso de proteínas de fusión ancladas a membranas (b), las células no deseables en el cuerpo tienen que expresar el gen que codifica la proteína de fusión. Esto puede lograrse mediante estrategias de terapia génica, es decir, transfectando las células in vivo con un vector plasmídico o vírico que dirige la expresión del gen que codifica la proteína de fusión en las células no deseables, o mediante la implantación en el cuerpo de células genéticamente modificadas para que expresen la proteína de fusión sobre su superficie. Estas últimas células normamente se implantan en el cuerpo dentro de una cápsula polimérica (terapia de células encapsuladas) en donde no pueden ser destruidas por un mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc. Sin embargo, si el dispositivo de cápsula falla y la liberación de las células se hace indeseable, entonces pueden ser eliminadas por la citotoxicidad celular mediada por Fc (Stabila, P.F., Nature Biotech., 16:1357 (1998)). En este caso, el método descrito en la presente se aplicará incorporando en el vector de terapia génica otro módulo de expresión génica que dirige unos niveles de expresión adecuados o máximos del polipéptido de fusión de la divulgación, o modificando genéticamente las células que se van a implantar para que expresen unos niveles adecuados o máximos del polipéptido de fusión de la divulgación.

40 Aplicaciones terapéuticas de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y polipéptidos de fusión producidos según los métodos de la divulgación.

45 Los anticuerpos (es decir, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las proteínas de fusión que comprenden una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina) de la presente divulgación pueden utilizarse por sí solos para dirigirse y matar células tumorales in vivo. Los anticuerpos también pueden utilizarse junto con un agente terapéutico apropiado para tratar el carcinoma humano. Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse en combinación con métodos de tratamiento convencionales, tales como quimioterapia, terapia de radiación o pueden conjugarse o ligarse a un fármaco terapéutico o toxina, así como a una linfoquina o a un factor del crecimiento inhibidor de tumores, para el transporte del agente terapéutico al sitio del carcinoma.

50 Las técnicas para conjugar estos agentes terapéuticos a anticuerpos son muy conocidas [véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-256 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-653 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-158 (1982)].

60 Como alternativa, un anticuerpo glicomodificado genéticamente puede acoplarse a radiación de alta energía, por ejemplo un radioisótopo, tal como  $^{133}\text{I}$ , que cuando se localiza en el sitio tumoral produce la muerte de varios diámetros celulares [véase, por ejemplo, Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-316 (Academic Press 1985)]. De acuerdo con otra realización más, los anticuerpos de la divulgación pueden conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo para el tratamiento de células tumorales según se describe en Segal, en la patente de EEUU n° 4.676.980.

65 Otras aplicaciones terapéuticas para los anticuerpos de la divulgación incluyen la conjugación o la unión, por ejemplo,

mediante técnicas de ADN recombinante, a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y el uso de este conjugado de anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco en un agente citotóxico en el sitio tumoral [véase, por ejemplo, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4842-4846 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activites of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", Cancer Research, 49: 5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody- Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy", FASEB J., 4:188-193 (1990)].

Otro uso terapéutico para los anticuerpos de la divulgación implica el uso, en presencia del complemento o como parte de un conjugado de anticuerpo- fármaco o anticuerpo-toxina, para eliminar células tumorales de la médula ósea de pacientes con cáncer. Según esta estrategia, la médula ósea autóloga puede purgarse ex vivo mediante un tratamiento con el anticuerpo, y la médula se infunde de nuevo al paciente [véase, por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", J. Clin. Immunol., 8(2):81-88 (1988)].

Además, pueden utilizarse de modo terapéutico anticuerpos quiméricos, inmunotoxinas recombinantes y otros constructos recombinantes de la divulgación que contengan la especificidad de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal deseado. Por ejemplo, las inmunotoxinas monocatenarias de la divulgación pueden utilizarse para tratar el carcinoma humano in vivo.

De manera similar, una proteína de fusión que comprenda al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la divulgación unido al menos a una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tenga actividad antitumoral, por ejemplo, una linfoquina u oncostatina, puede utilizarse para tratar el carcinoma humano in vivo. Además, las técnicas recombinantes conocidas en la técnica pueden utilizarse para construir anticuerpos específicos, en los que una de las especificidades de unión del anticuerpo se dirige a un antígeno asociado a tumores, mientras que la otra especificidad de unión del anticuerpo es la de una molécula que no sea dicho antígeno asociado a tumores.

La presente divulgación proporciona un método para eliminar de manera selectiva células tumorales que expresan un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal de la invención divulgada o un equivalente funcional. Este método comprende hacer reaccionar a los anticuerpos glicomodificados genéticamente de la presente divulgación o a los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) que comprenden a los mismos con dichas células tumorales. Las células tumorales pueden ser de un carcinoma humano.

Además, la divulgación proporciona un método para tratar carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este método comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene al menos uno de los anticuerpos glicomodificados genéticamente de la divulgación o un inmunoconjugado (por ejemplo, la inmunotoxina) que comprende a los mismos.

En un aspecto adicional, la divulgación se dirige a un método mejorado para tratar una enfermedad autoinmunitaria producida en su totalidad o en parte por autoanticuerpos patógenos basados en la eliminación de linfocitos B que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo inmunológicamente activo a un sujeto humano que lo necesite, comprendiendo la mejora administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que tenga ADCC aumentada preparado de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, trombocitopenias mediadas por el sistema inmunitario, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, nefritis por lupus, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis post-estreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, eritema multiforme, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, escleritis lateral amiotrófica, tabes dorsal, polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis de progresión rápida y alveolitis fibrosa, respuestas inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y escleritis sistémica; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo síndrome de dificultad respiratoria de adultos; ARDS); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveitis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas, tales como eccema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión leucocitaria; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); escleritis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomielite alérgica; síndrome de Sjörgen; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas con la hipersensibilidad aguda o retardada mediada por citoquinas y linfocitos T encontrada normalmente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión multiorgánica; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana basal antiglomerular; síndrome antifosfolípidos; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide buloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome del

hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis de complejo inmune; nefropatía por IgA; polineuropatías por IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc. En este aspecto de la divulgación, los anticuerpos de la divulgación se usan también para eliminar los linfocitos B de la sangre durante un periodo largo de tiempo.

5 De acuerdo con la práctica de esta divulgación, el sujeto puede ser un sujeto humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino y aviar. También se incluyen otros animales de sangre caliente en esta divulgación.

10 La presente divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto que padece cáncer. El sujeto puede ser un ser humano, un perro, un gato, un ratón, una rata, un conejo, un caballo, una cabra, una oveja, una vaca o un pollo. El cáncer puede identificarse como de mama, de vejiga, retinoblastoma, cistadenocarcinoma papilar del ovario, tumor de Wilm o carcinoma microcítico de pulmón y se caracteriza generalmente como un grupo de células que tienen antígenos asociados a tumores sobre la superficie celular. Este método comprende administrar al sujeto una cantidad eliminadora del cáncer de un anticuerpo dirigido a tumores unido a un agente citotóxico. Generalmente, la unión del anticuerpo dirigido a tumores con el agente citotóxico se lleva a cabo en condiciones que permiten que el anticuerpo unido de este modo se una a su diana en la superficie celular. Al unirse a su diana, el anticuerpo dirigido al tumor actúa directamente o indirectamente para provocar o contribuir a la eliminación de las células a las que se une, curando de este modo al sujeto.

20 También se proporciona un método para inhibir la proliferación de células tumorales de mamífero que comprende poner en contacto las células tumorales de mamífero con una concentración suficiente de los anticuerpos glicosilados genéticamente de la divulgación o de un inmunoconjugado que comprende a los mismos para inhibir la proliferación de las células tumorales de mamífero.

25 La divulgación proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, para tratar un tumor en un sujeto y para tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Estos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición de la divulgación.

30 Por lo tanto, es evidente que la presente divulgación abarca composiciones, combinaciones y métodos farmacéuticos para tratar carcinomas humanos. Por ejemplo, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de carcinomas humanos que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones pueden contener al anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, bien sin modificar, conjugados a un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco, una toxina o un segundo anticuerpo) o bien en una forma recombinante (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos). Las composiciones pueden incluir además otros anticuerpos o conjugados para tratar carcinomas (por ejemplo, un cóctel de anticuerpos).

40 Las composiciones de anticuerpos, conjugados de anticuerpo e inmunotoxinas de la divulgación pueden administrarse usando modos convencionales de administración incluyendo, pero sin limitación, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directa al tumor. Se prefiere la administración intravenosa.

45 Las composiciones de la divulgación pueden estar en diversas formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

50 Las composiciones de la divulgación también incluyen preferiblemente vehículos y adyuvantes convencionales farmacéuticamente aceptables conocidos en la materia, tales como albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias tamponadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, y sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina.

55 El modo de administración y la posología más eficaz para las composiciones de esta divulgación depende de la gravedad y el transcurso de la enfermedad, de la salud del paciente y de la respuesta al tratamiento, y del criterio del médico tratante. Por consiguiente, las dosis de las composiciones deben titularse para el paciente individual. Sin embargo, una dosis eficaz de las composiciones de esta divulgación pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg/kg.

60 Las moléculas descritas en el presente documento pueden estar en diversas formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

65 El modo de administración y la posología más eficaz para las moléculas de la presente divulgación depende de la localización del tumor que se esté tratando, de la gravedad y transcurso del cáncer, de la salud del sujeto y de la

respuesta al tratamiento y el criterio del médico tratante. Por consiguiente, las dosificaciones de las moléculas deben titularse para el sujeto individual.

La interrelación de dosificaciones para animales de diversos tamaños y especies basándose en mg/kg de área superficial se describe por Freireich, E. J., et al., Cancer Chemother., Rep. 50 (4): 219-244 (1966). Pueden efectuarse ajustes en la posología para optimizar la respuesta de inhibición del crecimiento y eliminación de células tumorales, por ejemplo, pueden dividirse las dosis y administrarse de manera diaria o se reduce proporcionalmente la dosis dependiendo de la situación (por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario o reducirse proporcionalmente dependiendo de la situación terapéutica específica).

Será evidente que la dosis de la composición de la divulgación necesaria para lograr la cura puede reducirse adicionalmente con una optimización de la pauta.

De acuerdo con la práctica de la divulgación, el vehículo farmacéutico puede ser un vehículo lipídico. El vehículo lipídico puede ser un fosfolípido. Además, el vehículo lipídico puede ser un ácido graso. También, el vehículo lipídico puede ser un detergente. Tal como se usa en el presente documento, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente disminuyéndola.

En un ejemplo de la divulgación, el detergente puede ser un detergente no iónico. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero sin limitación, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (monooleato de polioxietilensorbitán), Brij y Triton (por ejemplo, Triton WR-1339 y Triton A-20).

Como alternativa, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, pero sin limitación, bromuro de alquiltrimetilamonio.

Además, de acuerdo con la divulgación, el vehículo lipídico puede ser un liposoma. Tal como se usa en esta solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a membrana que contiene cualquier molécula de la divulgación o combinaciones de las mismas.

Los ejemplos que aparecen a continuación explican la invención con más detalle. Las siguientes preparaciones y ejemplos se ofrecen para permitir a los expertos en la técnica comprender mejor y practicar la presente invención. La presente invención, sin embargo, no se limita en su alcance a las realizaciones ejemplificadas, que solo pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los métodos que son funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la invención. De hecho, serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y de las ilustraciones adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1

#### Materiales y métodos

#### 1. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos

##### Vector de expresión de anticuerpos anti-CD20 pETR1502

El vector de expresión de anticuerpos anti-CD20 C2B8, pERT1502, consiste en cuatro módulos de expresión independientes y separados (uno para la cadena ligera del anticuerpo C2B8, otro para la cadena pesada del anticuerpo C2B8, otro para el gen de resistencia a la neomicina, y otro para el gen dhfr murino). Todos los genes están bajo el control del promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV) y contienen una señal de poliadenilación consenso sintética derivada de la señal de poliadenilación del gen de  $\beta$ -globina de conejo.

Los ADNc que codifican las regiones de cadena pesada variable (VH) y ligera variable (VL) del anticuerpo anti-CD20 C2B8 se ensamblaron a partir de un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios solapantes en un proceso en una etapa utilizando PCR (Kobayashi N. et al., Biotechniques, 23:500-503 (1997)). La secuencia original que codifica las regiones VH y VL de C2B8 se obtuvo de una solicitud de patente internacional publicada (n° de publicación internacional WO94/11026). Los fragmentos de ADNc de VH y VL ensamblados se subclonaron en pBluescriptIIKS(+) para producir los plásmidos pBlue-C2B8VH y pBlue-C2B8VL y se secuenciaron.

Las cadenas variables de C2B8 se amplificaron a partir de los correspondientes plásmidos pBlue-C2B8VH y pBlue-C2B8VL empleando cebadores que introducen un sitio de restricción Ascl en el extremo 5' y sitios de restricción apropiados en la unión de la región variable a la región constante (BsiWI para la cadena ligera y NheI para la cadena pesada). Las regiones constantes de IgG1 se amplificaron a partir de un banco de ADNc de leucocitos humanos (Quickclone, Clontech) empleando cebadores que introducen sitios de restricción adecuados en los extremos 5' y 3'

(BsiWI y BamHI para la cadena ligera constante, y NheI y BamHI para la cadena pesada constante).

Después de la confirmación de las secuencias de ADN correctas, las cadenas ligera y pesada del anticuerpo C2B8 se combinaron cada una con el promotor del MPSV y con señales de poliadenilación. En una primera etapa, se construyeron dos vectores de expresión diferentes: uno para la cadena ligera de C2B8 (pETR1315) y otro para la cadena pesada de C2B8 (pETR1316). En una segunda etapa, se introdujo un módulo de expresión de resistencia a la neomicina (gen de resistencia a la neomicina derivado del transposón Tn5 y bajo el control del promotor de MPSV mínimo) en el vector pETR1315, dando como resultado el plásmido pETR1481. Se insertó un módulo de expresión génica de dhfr bajo el control del promotor de MPSV en el vector pETR1316 para producir el plásmido pETR1328. En una etapa final, ambos módulos de expresión (cadena ligera de C2B8 + neo y cadena pesada de C2B8 + dhfr) se combinaron en un vector, dando como resultado el plásmido pETR1502.

#### Vector de expresión de anticuerpos anti-CD20 pETR1520

El pETR1520 combina un vector de expresión de anticuerpos anti-CD20 C2B8 con un origen de la replicación procedente del virus de Epstein-Barr (oriP) para la replicación del vector episómica y el mantenimiento en células que producen el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA). Para la construcción del vector de expresión de C2B8, pETR1520, el módulo de expresión de C2B8 de pETR1416 se insertó como un fragmento HinDIII en el vector que contiene oriP pETR1507. El vector pETR1416 es similar al pETR1502, con la excepción de que en este plásmido, el gen de resistencia a la neomicina está bajo el control del promotor de MPSV completo, en lugar de mínimo.

#### Vector de expresión de anticuerpos anti-fibronectina pETR1546

Este vector es el mismo que el vector pETR1520, excepto que las regiones codificadoras de la cadena pesada y ligera variables del anticuerpo anti-CD20 C2B8 se han reemplazado por las respectivas regiones codificadoras del anticuerpo L19, un anticuerpo humano que reconoce el dominio ED-B de la fibronectina. Los fragmentos de ADN que codifican la región variable se sintetizaron mediante un método de PCR de extensión de solapamiento utilizando oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia de las regiones variables del anticuerpo L19 (Pini, A. et al., J. Biol. Chem., 273(34):21769-21776 (1998)).

#### Vector de expresión de anticuerpos (C225) anti-EGFR pURS128

Este vector es el mismo que el vector pETR1520, excepto que las regiones codificadoras de la cadena pesada y ligera variables del anticuerpo anti-CD20 C2B8 se han reemplazado por las respectivas regiones codificadoras del anticuerpo C225, un anticuerpo quimérico que reconoce el receptor del factor del crecimiento epidérmico humano. Los fragmentos de ADN que codifican la región variable se sintetizaron mediante un método de PCR de extensión de solapamiento utilizando oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia de las regiones variables del anticuerpo C225 (las secuencias pueden encontrarse en la solicitud de patente publicada con el n° de publicación internacional WO 96/40210, figs. 16 y 17 de esta solicitud de patente para las cadenas pesada y ligera, respectivamente).

### 2. Construcción de vectores de expresión de la fusión de GnTIII

#### pETR1166: Vector para la expresión constitutiva de GnTIII

Para la construcción del vector de expresión de GnTIII pETR1166, se amplificó GnTIII de rata a partir de un banco de ADNc de riñón de rata (Clontech) mediante PCR. Se añadió un marcador de epítipo c-myc C-terminal inmediatamente cadena arriba del codón de fin del gen (secuencia de aminoácidos: PEQKLISEEDL) para la posterior detección conveniente de GnTIII mediante transferencias Western. Después de la confirmación de la secuencia correcta de GnTIII, el gen se insertó bajo el control del promotor MPSV y se añadió un sitio de poliadenilación de beta-globina de conejo sintético. El vector de expresión de GnTIII final también contenía un módulo de resistencia a la puomicina distinto para la selección, estando el gen de resistencia a la puomicina también bajo el control del promotor MPSV y la señal de poliadenilación de beta-globina de conejo sintética.

pETR1425: Sustitución de los primeros 76 aminoácidos de GnTIII por los primeros 102 aminoácidos de GnTI humana

La construcción de este gen de glicosiltransferasa híbrido se realizó mediante posteriores reacciones de PCR solapantes. En una reacción, la región troncal de la GnTI humana se amplificó utilizando los cebadores GAB-179 y GAB-180. Durante esta reacción de PCR también se introducen una secuencia consenso Kozak y un sitio de restricción Ascl en el extremo 5'. El fragmento de PCR resultante tiene un solapamiento de 23 pb con GnTIII que comienza en la posición 229. En una segunda reacción de PCR, la región de GnTIII desde la posición 229 a 380 se amplificó con los cebadores GAB-177 y Gap-178, generando un fragmento de PCR con un sitio BstXI exclusivo en el extremo 3' y un solapamiento de 22 pb con la región troncal de GnTI en el extremo 5'. Ambos fragmentos de PCR se purificaron y se emplearon como moldes en una tercera reacción de PCR (cebadores GAB-179 y GAB-178). El fragmento resultante se purificó y se digirió con Ascl y se acopló en el vector pETR1001 (cortado con Ascl y SmaI), dando como resultado el plásmido pETR1404. Después de confirmar la secuencia del inserto se añadió el elemento promotor de MPSV al pETR1404 como un fragmento Ascl (digestión parcial)/PmeI, produciendo el plásmido

pETR1423. El fragmento SphI/BstXI de pETR1166, un vector de expresión que porta el gen GnTIII de rata original, entonces se reemplazó por el correspondiente fragmento de pETR1423, produciendo el plásmido pETR1425 que contiene la fusión de GnTI- GnTIII bajo el control del promotor de MPSV y un módulo de resistencia a la puromicina para la selección.

Secuencias de cebadores:

GAB-177: GCGTGTGCCTGTGACCCCCGCGCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCC

GAB-178: GAAGGTTTCTCCAGCATCCTGGTACC

GAB-179: CTGAGGCGCGCCGCCACCATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGC

GAB-180: GGGGACAGTGGCTGGAGCAGGGGCGCGGGGTACAGGCACACGCGGC

pETR1506: Sustitución de los 76 aminoácidos N-terminales de GnTIII por los primeros 100 aminoácidos de la manosidasa II humana

La construcción de pETR1506 se realizó de modo análogo a la construcción de pETR1425. La región troncal del gen de la manosidasa II humana se amplificó con los cebadores GAB-252 y GAB-253, utilizando el vector pBlue-man como molde. Durante esta PCR se introducen un sitio FseI y una secuencia consenso Kozak en el extremo 5'. El fragmento de PCR resultante se solapa con el gen GnTIII comenzando en la posición 229 en 23 pb. En una segunda reacción de PCR, una parte del gen GnTIII (posición 229-460) se amplificó con los cebadores GAB-254 y GAB-255. Esta reacción de PCR generó un fragmento que contenía un solapamiento de 43 pb con el gen de la manosidasa II en el extremo 5' y un sitio StuI exclusivo en el extremo 3'. Ambos fragmentos se purificaron y se emplearon como moldes en una tercera PCR con los cebadores GAB-252 y GAB-255. El fragmento resultante se insertó en pIC 19H, dando como resultado el vector pETR1484. Después de confirmar la correcta secuencia del inserto se construyó el gen de fusión completo acoplando el fragmento FseI/StuI de pETR1484 con el fragmento StuI/BamHI de pETR1166 en el vector pETR12177 (FseI/BamHI). El plásmido resultante (pETR1500) contenía el gen híbrido manII-GnTIII (SEC ID N°: 14) bajo el control del promotor de MPSV. Para la selección del plásmido en células de mamífero, se insertó un gen de resistencia a la puromicina como un fragmento SpeI de pETR1166, produciendo el plásmido pETR1506.

Secuencias de cebadores:

GAB-252:  
GCTAGGCCGGCGCCACCATGAAGTTAAGCCGCCAGTTCACCGTGTTCCG

GAB-253:  
GGGGAGAGTGGCTGGAGCAGGGGTGAGCCAGCACCTTGCTGAAATTGCTTTGTGAACTTTTCGG

GAB-254:  
TCCGAAAAGTTCACAAAGCAATTTAGGCAAGGTGCTGGCTCACCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCC  
GAB-255: ATGCCGCATAGGCCTCCGAGCAGGACCCC

pETR1519: Combinación del gen de fusión híbrido manII-GnTIII con el origen de la replicación oriP del virus de Epstein-Barr

Utilizando los cebadores GAB-261 y GAB-262 se amplificó un fragmento de 2 kb que contenía oriP a partir del plásmido pCEP4 (Invitrogen). Durante esta reacción de PCR se introdujeron sitios SspI y EcoRI en ambos extremos del fragmento. Para la secuenciación, el fragmento oriP se insertó en el vector pIC19H. Después de confirmar la secuencia correcta, el oriP se insertó como un fragmento SspI en el vector pETR1001 (digerido con BsmBI y rellenando los extremos 5' solapantes utilizando polimerasa de Klenow). El plásmido resultante se denominó pETR1507. Un módulo de expresión SphI/NruI de manII-GnTIII procedente de pETR1510 se insertó en pETR1507 digerido con las mismas endonucleasas de restricción, produciendo el plásmido pETR1519.

Secuencias de cebadores:

GAB-261: GCTAAATATTGAATTCCCTTTATGTGTAACCTCTTGGCTGAAGC

GAB-262: TAGCAATATTGAATTCGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATTCACGC

pETR1537: Combinación del gen de fusión híbrido manII-GnTIII y un gen marcador de CD4 de la superficie celular truncada

El vector de expresión pETR1506 se modificó para la expresión adicional de un gen marcador de CD4 de la superficie celular truncada. Brevemente, el módulo de expresión del gen de fusión híbrido manII-GnTIII se convirtió de un módulo de expresión monocistrónico a bicistrónico insertando, cadena abajo del codón de fin de la fusión de manII-GnTII, un elemento IRES del virus de la polio, seguido de un ADNc que codifica una proteína CD4 humana truncada (que

comprende la secuencia conductora de CD4 humana para la secreción, seguida de los dominios transmembrana y extracelular).

### 3. Transfección de células de mamífero con vectores de expresión de anticuerpos y de fusión de GnTIII

#### Transfección de células BHK

Se sembraron células en crecimiento exponencial (viabilidad 90-95 %) en un número apropiado de matraces T75 a una concentración de  $0,9 \times 10^6$  células/ml durante 24 h antes de la electroporación. Como medio de cultivo se utilizó Invitrus (Cell Culture Technologies, Suiza) suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS). Las células se contaron antes de la electroporación. Se recolectaron  $8 \times 10^6$  células mediante centrifugación (5 min, 200 x g) y se rechazó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 800 µl de medio Invitrus y se trasladaron a una cubeta de electroporación estéril (hueco 0,4 cm) que ya contenía 8 µg de ADN plasmídico circular y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se electroporaron utilizando un Gene Pulser II (BioRad) con las siguientes condiciones: 400 V, 960 µF con dos pulsos en un intervalo de 30 s. Después de la electroporación, las células se trasladaron inmediatamente a un matraz T25 que contenía 5 ml de medio de crecimiento (Invitrus/FCS al 20 % (en v/v)/DMSO al 1,25 % (en v/v)) y se incubaron a 37 °C en un incubador con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Para la producción de anticuerpos no modificados (no glicosilados genéticamente), las células se transfectaron sólo con vectores de expresión de anticuerpos. Para la producción de anticuerpos glicosilados genéticamente, las células se cotransfectaron con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos y el otro para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (SEC ID N°: 15), a una proporción de 3:1, respectivamente.

#### Transfección de células HEK293-EBNA

Células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio. Las células se cultivaron como cultivos en monocapas adherentes en matraces T utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10 %, y se transfectaron cuando fueron entre 50 % y 80 % confluentes. Para la transfección en un matraz T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10 % final en v/v), neomicina 250 µg/ml, y las células se colocaron a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche. Para cada matraz T75 que se va a transfectar, se preparó una solución de ADN, CaCl<sub>2</sub> y agua mezclando 47 µg de ADN del vector plasmídico total, 235 µl de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M, y añadiendo agua hasta un volumen final de 469 µl. A esta solución se le añadieron 469 µl de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 s y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM suplementado con FCS al 2 %, y se añadió a T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante aproximadamente 17 a 20 horas, después el medio se reemplazó por 12 ml de DMEM, FCS al 10 %. Para la producción de anticuerpos no modificados (no glicosilados genéticamente), las células se transfectaron sólo con vectores de expresión de anticuerpos. Para la producción de los anticuerpos glicosilados genéticamente, las células se cotransfectaron con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos y el otro para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII, a una proporción de 4:1, respectivamente. En el día 5 después de la transfección, el sobrenadante se recolectó, se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvo a 4 °C.

#### Generación de una línea celular de mamífero estable que expresa un anticuerpo anti- CD20 recombinante

Se transfectaron células BHK (BHK21-13c) mediante electroporación con el vector de expresión de anticuerpos C2B8 pETR1502, que contiene un módulo de expresión del gen de resistencia a la neomicina. Los clones resistentes a la neomicina primero se seleccionaron para obtener un conjunto de clones que tenían integrado cromosómicamente el ADN del vector pETR1502. Los clones entonces se seleccionaron para la producción de anticuerpos recombinantes utilizando un ensayo ELISA. Brevemente, 24 horas después de la electroporación, las células viables se contaron y se determinó la eficacia de la transfección contando las células fluorescentes de una electroporación control paralela realizada con un vector de expresión de pEYFP. Las células se diluyeron en medio de selección Invitrus que contenía FCS al 10 % y 1 mg/ml de neomicina. Normalmente, se siembran ocho placas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de células transfectadas viables ( $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $1 \times 10^2$  células por pocillo) y se incuban a 37 °C hasta que pueden identificarse los clones. Cuando los clones han crecido hasta casi la confluencia, los sobrenadantes se analizan mediante ELISA para la producción de anticuerpos. Los clones positivos en ELISA se expandieron primero en placas de 24 pocillos y después en placas de 6 pocillos, y después en matraces T25. Después de cinco días de crecimiento en matraces T25, se determinó la valoración de anticuerpos final utilizando un ensayo ELISA. Utilizando este procedimientos de electroporación y selección, se aisló un clon de células BHK que expresa el anticuerpo anti-CD20 C2B8 (BHK-1502- 2S) que produjo 13 µg/ml de anticuerpos bajo las condiciones de cultivo anteriores.

Generación de una línea de células de mamífero estable que expresa un anticuerpo anti-CD20 recombinante y una fusión de GnTIII

El clon BHK-1502-28, que expresa constitutivamente los genes del anticuerpo monoclonal anti-CD20 y el gen de resistencia a la neomicina, se transfectó con el vector de expresión pETR1537 mediante electroporación. El pETR1537

es un vector para la expresión constitutiva del gen ManII-GnTIII y una forma truncada de CD4 humana, estando la última expresada de modo dependiente de IRES. El vector también contiene un módulo de expresión del gen de la resistencia a la puomicina. Los clones resistentes a la puomicina primero se seleccionaron para obtener un conjunto de clones que tenían integrado cromosómicamente el ADN del vector pETR1537. Los clones entonces se seleccionaron para la expresión en la superficie de CD4 truncada (tCD4), que actúa como marcador para el nivel de expresión de la unidad de expresión del gen ManII-GnTIII+tCD4 bicistrónico. Se verificó la producción de anticuerpos recombinantes de los clones seleccionados utilizando un ensayo ELISA.

Brevemente, el ADN del vector pETR1537 se linealizó con XmnI. Se realizó una transfección control en paralelo con un vector de expresión de EYFP. Se determinó la eficacia de la transfección después de 24 horas contando las células que expresaban EYFP frente al total de células. De todas las células, 58 % expresaban EYFP. La viabilidad celular fue 91 %. Un día después de la transfección, las células transfectadas con pETR1537 o pEYFP se diluyeron en serie en diluciones de 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:5000, y se sembraron en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 0,2 ml de medio de selección (Invitrus, FCS al 10 %, puomicina 20 µg/ml, neomicina 1 mg/ml). Los clones fueron visibles después de dos semanas. Se expandieron y se seleccionaron para la expresión de CD4 truncada (tCD4) y la expresión de anticuerpos.

Para la selección del nivel de expresión de tCD4, aproximadamente 500.000 células se lavaron con tampón FACS y se incubaron con 5 µl de anti-CD4 humana FITC (Becton Dickinson, Suiza) durante 20 min en hielo. Después de dos lavados, las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón FACS y se analizaron con un FACS (figura 17A-B). Se aisló un clon con un buen nivel de expresión de tCD4 (BHK-1502- 28-11). Después de 5 días de crecimiento en un matraz T25, el clon produjo anticuerpo anti-CD20 a una valoración final de aproximadamente 17 µg/ml, según se determinó mediante ELISA.

#### 4. Producción y purificación de anticuerpos no modificados y glicomodificados genéticamente

##### Recolección del medio de cultivo

En el caso de células BHK transfectadas con un vector de expresión de anticuerpos o cotransfectadas con un vector de expresión de anticuerpos más un vector de expresión de fusión de GnTIII, el sobrenadante del cultivo se recolectó después de cultivar las células transfectadas durante 96 h después de la transfección. Dependiendo de la productividad esperada, se realizaron varias electroporaciones (1015) para el mismo vector.

En el caso de células HEK293-EBNA transfectadas con un vector de expresión de anticuerpos o cotransfectadas con un vector de expresión más un vector de expresión de fusión de GnTIII, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo fresco aproximadamente 16 horas después de la transfección, y este último medio entonces se recolectó después de cultivar las células transfectadas durante 120 horas más.

Para la línea celular BHK-1502-29-11 estable, se sembró un cultivo a 500.000 células/ml y el sobrenadante se recolectó después de 4 días de cultivo cuando la densidad celular era de  $1,7 \times 10^6$  células viables/ml y la viabilidad celular era 69 %.

##### Purificación de anticuerpos

El anticuerpo monoclonal se purificó a partir del sobrenadante del cultivo utilizando dos etapas cromatográficas secuenciales. La primera etapa consistía en una cromatografía de proteína A utilizando una elución en gradiente de pH que separa de modo eficaz las IgG bovina y humana. A esto le siguió una etapa cromatográfica de intercambio catiónico para intercambiar el tampón de muestra a solución salina tamponada con fosfato (PBS).

#### 5. Análisis de oligosacáridos

Los oligosacáridos fueron liberados enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, estando los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución.

La solución digerida resultante contenía los oligosacáridos liberados preparados directamente para un análisis MALDI/TOF-MS o posteriormente se digirió con glicosidasa EndoH antes de la preparación de las muestras para el análisis MALDI/TOF-MS.

##### Método para la liberación de oligosacáridos para anticuerpos inmovilizados sobre membranas de PVDF

Los pocillos de una placa de 96 pocillos fabricada con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) se humedecieron con 100 µl de metanol, y el líquido se hizo pasar a través de una membrana de PVDF utilizando un vacío aplicado al colector de vacío Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Los pocillos entonces se lavaron con 50 µl de tampón RCM (urea 8 M, Tris 360 mM, EDTA 3,2 mM, pH 8,6). Se cargaron entre 30-40 µg de anticuerpo en un pocillo que contenía 10 µl de tampón RCM. El líquido en el pocillo se hizo pasar a través de la membrana aplicando un vacío, y la



membrana posteriormente se lavó dos veces con 50 µl de tampón BCM. La reducción de los puentes disulfuro se realizó mediante la adición de 50 µl de ditiotreitól 0,1 M en RCM y una incubación a 37 °C durante 1 h.

Tras la reducción, se aplicó un vacío para eliminar la solución de ditiotreitól del pocillo. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de agua antes de realizar la carboximetilación de los restos cisteína mediante la adición de 50 µl de ácido yodoacético 0,1 M en tampón RCM y una incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

Después de la carboximetilación, los pocillos se sometieron al vacío y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de agua. La membrana de PVDF entonces se bloqueó para evitar la adsorción de la endoglicosidasa incubando 100 µl de una solución acuosa al 1 % de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo de bloqueo entonces se retiró mediante un vacío suave, seguido por tres lavados con 300 µl de agua.

Los oligosacáridos N-enlazados se liberaron mediante la adición de péptido-N- glicosidasa F 2,5 mU (N-glicanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y sialidasa 0,1 mU (GLYKO, Novato, CA) para eliminar cualquier resto monosacárido cargado potencial, en un volumen final de 25 µl de NaHCO<sub>3</sub> 20 mM, pH 7,0. La digestión se realizó durante 3 horas a 37 °C.

#### Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución

Entre 40 y 50 µg de anticuerpo se mezclaron con 2,5 mU de PNGasaF (Glyko, EEUU) en Tris 2 mM, pH 7,0, en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C.

#### Uso de la digestión con endoglicosidasa H de oligosacáridos liberados con PNGasaF para la asignación de estructuras de oligosacáridos bisectados híbridos a picos de oligosacáridos neutros de MALDI-TOF-MS

Los oligosacáridos liberados con PNGasaF posteriormente se digirieron con endoglicosidasa H (EC 3.2.1.96). Para la digestión con EndoH, se añadieron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) al digerido de PNGasaF (método de anticuerpos en solución anterior) para producir un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C. La EndoH realiza la ruptura entre los restos N- acetilglucosamina del núcleo de quitobiosa de los oligosacáridos N-enlazados. La enzima sólo puede digerir la oligomanosa y la mayoría de los glicanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizan.

#### Preparación de muestras para MALDI/TOF-MS

Los digeridos enzimáticos que contiene los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h más a temperatura ambiente después de la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y posteriormente se hicieron pasar a través de 0,6 ml de una resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma de hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) cargada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para eliminar los cationes y las proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa diana de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz sDHB. La matriz sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (en v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 µl de etanol, y por último se dejó que las muestras cristalizaran al aire.

#### MALDI/TOF-MS

El espectrómetro de masas MALDI/TOF-MS utilizado para adquirir los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20 kV y 80 ns de retraso. Se empleó una calibración externa utilizando patrones de oligosacáridos para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 disparos de láser se sumaron para obtener el espectro final.

#### 6. Preparación de PBMC

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178, EEUU) y siguiendo fundamentalmente las instrucciones del fabricante. Brevemente, se extrajo sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios que había estado corriendo durante 1 minuto a toda potencia para aumentar el porcentaje de células asesinas naturales (NK) en la sangre. La sangre se diluyó 1:0.75-1,3 con PBS que no contenía Ca ni Mg, y se extendió sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente sin interrupciones. La interfase que contenía las PBMC se recogió y se lavó con PBS (50 ml por células de los dos gradientes) y se recolectó mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la resuspensión del sedimento con PBS, las PBMC se contaron y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se resuspendieron en el medio apropiado para los posteriores procedimientos.

## 7. Aislamiento de células NK

Se aislaron células NK humanas a partir de PBMC aplicando un procedimiento de selección negativa utilizando esferas magnéticas que no se unen a células positivas a CD16 ni positivas a CD56 (sistema MACS de Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, Alemania). Las PBMC se lavaron una vez en tampón MACS enfriado en hielo (PBS que contenía FCS al 2 % y EDTA 2 mM), se resuspendieron a 20 millones de células por ml de una mezcla de FCS y tampón MACS 1:1, y se incubaron durante 10 min a 4 °C. Las células entonces se sedimentaron y se resuspendieron en 80 µl por 10 millones de células con tampón MACS que contenía FCS al 10 %. Después se añadieron 20 µl de solución de anticuerpos-hapteno por 10 millones de células. Las células se incubaron durante 10 min a 4 °C con agitación repetida del tubo. Después de dos lavados con tampón MACS en al menos 10 x volumen de marcaje, las células se resuspendieron en tampón MACS que contenía FCS al 10 % a 10 millones de células por 80 y se añadieron 20 µl de microesferas anti-hapteno por 10 millones de células. El tubo se incubó durante 15 minutos a 4 °C con agitación repetida del tubo. Después de un lavado con tampón MACS, las células se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón MACS, y se cargaron en una columna LS MACS que se colocó en un imán MINI-MACS y se equilibró con 3 ml de tampón MACS. La columna se lavó con 3 x 3 ml de tampón MACS. Las células en la fracción de corriente se recogieron y posteriormente se emplearon como células NK. La pureza, determinada mediante la expresión de CD56, era de entre 88-95 %.

## 8. Ensayo de ADCC

Se prepararon células PBMC o NK como células efectoras como se describió anteriormente. La proporción de efectoras a diana era de 25:1 y 10:1 para las células PBMC y NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V con la concentración apropiada para añadir 50 µl por pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana para el anticuerpo C2B8 eran células SKW6.4 o de linfoma de células B Namalwa cultivadas en DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0,3 millones por ml para añadir 30.000 células en 100 µl por micropocillo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50 µl a las células diana precultivadas en placa y se dejó que se uniesen a las dianas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %. La muerte de las células diana se evaluó midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDIT) de las células dañadas utilizando el kit de detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Después de una incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800 x g. Se trasladaron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano transparente. Se añadieron 100 µl de tampón de sustrato de color del kit a cada pocillo. Los valores de Vmax de la reacción de color se determinaron en un lector ELISA a 490 nm durante al menos 10 min utilizando el programa informático SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, EEUU). Se midió la liberación de LDH espontánea de los pocillos que contenían sólo células diana y efectoras pero sin anticuerpos. Se determinó la liberación máxima en los pocillos que contenían sólo células diana y Triton X-100 al 1 %. Se calculó el porcentaje de muerte mediada por anticuerpos específicos como sigue:  $((x - LE)/(LM - LE) * 100$ , en la que x es la media de Vmax a una concentración de anticuerpos específicos, LE es la media de Vmax de la liberación espontánea, y LM es la media de Vmax de la liberación máxima.

## 9. Unión a FcγRIIIA sobre células NK

Células NK recién aisladas se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x g y se pretrataron con una solución de ácido láctico al 0,09 % (en p/v) (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, pH 3,9), incubando  $3 \times 10^5$  células/ml a temperatura ambiente durante 5 minutos, para eliminar la IgG asociada a las células NK (De Haas M., J. Immunol., 156:2948 (1996)).

Las células se lavaron dos veces con PBS, BSA al 0,1 %, azida de sodio al 0,01 % y se ajustó la concentración a  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS, BSA al 0,1 %, azida de sodio al 0,01 %. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células con variantes de anticuerpos 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 µg/ml durante 30 min a 4 °C. Las células entonces se lavaron dos veces y se detectó la unión de los anticuerpos incubando con F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y anti-CD56-PE humano a 5 µl /  $5 \times 10^5$  células (BD Pharmingen, San Diego, CA) durante 30 minutos a 4 °C (Shields R. et al., J. Biol. Chem., 277(30):26733- 26740 (2002)).

Se determinó la intensidad de fluorescencia con respecto a los variantes de anticuerpos unidos para las células CD56+ en un FACSCalibur (BD Bioscience, San José, CA).

## 10. Unión a FcγgammaRIIb sobre células de linfoma Raji

Células de linfoma de células B humano Raji se lavaron durante 20 min a 37 °C en PBS (concentración 0,3 millones de células/ml). Las células entonces se resuspendieron a 2,22 millones de células/ml en PBS, BSA al 0,1 %, NaNs al 0,01 %, y se añadieron 180 µl por tubo FACS. Se añadieron diluciones en diez veces de los anticuerpos (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 µg/ml) de anticuerpos monoclonales L19 no modificados y L19 glicomodificados genéticamente a las células Raji, y se incubaron durante 4 °C durante 30 min (concentración final de células 2 millones de células/ml). Después de dos lavados, se añadió 1:200 de F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a las células y se incubó a 4 °C durante 30 min. Después de un lavado, las células se resuspendieron en 0,5 ml de PBS, BSA al 0,1 %, NaN al 0,01 %, y se determinó la intensidad de fluorescencia con respecto a los variantes de anticuerpos unidos en un FACSCalibur (BD Bioscience, San José, CA).

para las células vivas.

#### 11. Ensayo de la citotoxicidad dependiente del complemento

- 5 Las células diana se contaron, se lavaron con PBS, se resuspendieron en AIM- V (Invitrogen) a 1 millón de células por ml. Se cultivaron 50 µl de células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se prepararon diluciones de anticuerpos en AIM-V y se añadieron en 50 µl a las células. Se dejó que los anticuerpos se unieran a las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descongeló complemento de suero humano (Quidel), se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pocillos. Se preparó complemento de conejo (Cedarlane Laboratories) como describe el fabricante, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pocillos. Como control, se calentaron fuentes de complemento durante 30 min a 56 °C antes de la adición al ensayo.

- 15 Las placas de ensayo se incubaron durante 2 h a 37 °C. Se determinó la muerte de las células midiendo la liberación de LDH. Brevemente, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 3 min. Se trasladaron 50 µl por pocillo a una nueva placa de 96 pocillos y se añadieron 50 µl del reactivo de ensayo del kit de citotoxicidad (Roche). Una medida cinética con el lector ELISA determinó la V<sub>max</sub> que se corresponde con la concentración de LDH en el sobrenadante. La liberación máxima se determinó incubando las células en presencia de Triton X-100 al 1 %.

Resultados y análisis

- 20 Se produjeron variantes glicomodificadas genéticamente de un anticuerpo IgG quimérico anti- CD20 (anticuerpo quimérico C2B8, también conocido como rituximab) cotransfectando cultivos de células de mamífero con vectores para la expresión de genes de anticuerpos y con vectores para la expresión de genes que codifican diversos polipéptidos con actividad GnTIII. Se produjo una versión no modificada (no glicomodificada genéticamente) del mismo anticuerpo transfectando células de mamífero sólo con el vector para la expresión de genes de anticuerpos. Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante al menos tres días, y los anticuerpos segregados recombinantes se purificaron a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad de proteína A. La expresión de genes que codifican polipéptidos con actividad GnTIII no produjo un efecto significativo sobre la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de anticuerpos, con relación a las células que no producen estos polipéptidos.

- 30 Los anticuerpos purificados entonces se analizaron para sus patrones de glicosilación. Estos anticuerpos portan oligosacáridos N-enlazados unidos sólo al resto Asn297 de la región Fc de IgG humana. Los oligosacáridos se eliminaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF y posteriormente se analizaron mediante MALDI/TOF-MS. Utilizando esta técnica, es posible determinar la fracción de las diferentes especies de oligosacáridos dentro de la población total y original de Fc-oligosacáridos, y también es posible asignar estructuras a diferentes picos en los espectros (Umana, P. et al., Nature Biotechnol., 17:176-180 (1999)).

- 40 La figura 1 muestra los perfiles de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos neutros del anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante producido en células BHK. Estas células se transfectaron con el vector de expresión de anticuerpos pETR1502. Las figuras 2 a 4 muestran los correspondientes perfiles para el mismo anticuerpo producido por células BHK modificadas con ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con actividad GnTIII. El perfil de la figura 2 resulta del uso de un ácido nucleico que codifica GnTIII de tipo salvaje expresado a partir del vector pETR1166. El perfil de la figura 3 resulta del uso de un ácido nucleico que codifica un polipéptido fusión que comprende, en el N-terminal, el dominio de localización de GnTI condensado al dominio catalítico C-terminal de GnTIII. Este gen de fusión se expresó a partir del vector pETR1425. El perfil de la figura 4 resulta del uso de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que comprende, en el N-terminal, el dominio de localización en Golgi de la  $\alpha$ -manosidasa II (ManII) condensado con el dominio catalítico de GnTIII. Este gen de fusión se expresó a partir del vector pETR1506.

- 50 El anticuerpo no modificado tiene un perfil de oligosacáridos típico (figura 1), siendo los picos a proporciones m/z de 1485, 1648 y 1810 coherentes con oligosacáridos complejos de núcleo fucosilado biantenarios con 0, 1 y 2 restos galactosa, respectivamente. Se encuentran perfiles similares para los oligosacáridos de la región Fc de anticuerpos IgG1 no modificados producidos en otras líneas celulares de mamífero industriales, tales como células CHO y células de mieloma de ratón (Lifely, M.R. et al., Glycobiology, 5(8):813-822 (1995)). La modificación genética de las células productoras de anticuerpos mediante la expresión de GnTIII de tipo salvaje conduce principalmente a oligosacáridos biantenarios complejos de núcleo fucosilado bisectados (figura 2), siendo los picos a proporciones m/z de 1689, 1851 y 2014 los homólogos bisectados de los picos de oligosacáridos fucosilados no bisectados encontrados en el anticuerpo no modificado. La modificación genética de las células productoras de anticuerpos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de GnTI-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de GnTI, también conduce principalmente a oligosacáridos biantenarios complejos bisectados (nótese los picos a m/z 1689 y 1851 en la figura 3). Sin embargo, con relación a la GnTIII de tipo salvaje, el uso de una fusión de GnTI-GnTIII conduce a un aumento en estructuras híbridas bisectadas, no fucosiladas y bisectadas (compárense las proporciones de picos con m/z de 1684, 1810, 1826 y 1973, con relación al total, entre las figuras 2 y 3). La síntesis de estructuras híbridas, bisectadas, no fucosiladas y bisectadas, resulta de la competición por los sustratos de oligosacáridos modificados con GnTI entre el dominio catalítico de GnTIII recombinante y (i) el núcleo endógeno de  $\alpha$ 1,6- fucosiltransferasa, (ii) Golgi de  $\alpha$ -manosidasa II (ManII), y (iii) GnTII, puesto que cuando un oligosacárido es modificado con un GlcNAc bisectante añadido a través una reacción catalizada

por GnTIII, estas tres enzimas distintas ya no pueden actuar para modificar genéticamente los oligosacáridos bisectados. Por tanto, la acción de bloqueo de ManII mediante la adición de GlcNAc bisectante también bloquea, de forma eficaz, la GnTII puesto que la GnTII actúa cadena debajo de ManII en la vía biosintética de los oligosacáridos N-enlazados. Los picos a m/z 1664 y 1826 están no fucosilados, mientras que los picos a m/z 1810 y 1973 están fucosilados. Se empleó una digestión con glicosidasa EndoH, que puede distinguir entre los oligosacáridos híbridos y complejos (figura 8A), para confirmar que el aumento en estos picos es debido a un aumento en la proporción de oligosacáridos híbridos, bisectados, no fucosilados y bisectados, unidos a Fc (véase a continuación).

Por contraste con los otros ácidos nucleicos que codifican actividad GnTIII utilizados en la presente, la modificación genética de las células productoras de anticuerpos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManIII-GnTIII (SEC ID N°: 14), en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, conduce principalmente a estructuras híbridas, bisectadas, no fucosiladas y bisectadas (nótese los picos a m/z 1664, 1810, 1826 y 1973 en la figura 4). Por tanto, con relación a la GnTIII de tipo salvaje y a la fusión de GnTI-GnTIII (SEC ID N°: 12 y 13), la fusión de ManII-GnTIII es más eficaz en la síntesis de oligosacáridos híbridos, bisectados, no fucosilados y bisectados, unidos a Fc (compárense las proporciones de los picos con m/z de 1664 y 1810 con relación al total entre las figuras 2, 3 y 4). Las proporciones de oligosacáridos-Fc bisectados, no fucosilados que resultan de la expresión de los ácidos nucleicos que codifican GnTIII de tipo salvaje, la fusión de GnTI-GnTIII y la fusión de ManII-GnTIII eran de aproximadamente 4 %, 13 % y 33 %, respectivamente. No se detectaron oligosacáridos no bisectados en el anticuerpo no modificado.

Aumentado la expresión del constructo de fusión de ManII-GnTIII en las células productoras de anticuerpos conduce a un mayor aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados, no fucosilados. Esto se demostró mediante la expresión del constructo de ManII-GnTIII a partir de un vector (pETR1519) con un OriP para la replicación episómica en células HEK293-EBNA transfectadas. Se sabe que este sistema de expresión conduce a altos niveles de expresión, y también se empleó para la expresión de genes de anticuerpos a partir del vector pETR1520. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo purificado, no modificado (no glicomodificado genéticamente) expresado a altos niveles en este sistema se muestra en la figura 5, que de nuevo demuestra el perfil de oligosacáridos típico con picos de oligosacáridos no bisectados, fucosilados que tienen 0, 1 y 2 restos galactosa (por ejemplo, compárense las figuras 1 y 5, que muestran los similares perfiles de oligosacáridos del anticuerpo no modificado expresado en células BHK o a niveles más altos en células HEK293-EBNA). La modificación genética de células productoras de anticuerpos con el ácido nucleico que codifica la fusión de ManII-GnTBI expresada a mayores niveles en este sistema condujo a la producción de anticuerpos en los que la mayoría de los oligosacáridos-Fc estaban bisectados y no fucosilados (véase la figura 6, en que los picos de oligosacáridos híbridos, bisectados, no fucosilados a m/z 1664 y 1826 constituyen juntos más de 90 % de los oligosacáridos totales).

Tal como se mencionó anteriormente, se empleó la endoglicosidasa H (EndoH) para confirmar la asignación de estructuras híbridas, bisectadas, no fucosiladas y bisectadas, a los diferentes picos de oligosacáridos observados en los perfiles de MALDI. Los perfiles de oligosacáridos neutros de MALDI/TOF-MS de glicanos digeridos con PNGasaF y PNGasaF+EndoH derivados de un anticuerpo IgG anti- CD20 quimérico, producidos por células HEK293 glicomodificadas genéticamente mediante la sobreexpresión de GnTIII(M2), se muestran en la figura 7. El pico a m/z 1664 puede asignarse a dos glicanos diferentes, a saber, un glicano híbrido bisectado no fucosilado o un glicano complejo no fucosilado no bisectado. Las diferentes estructuras muestran la misma proporción de m/z debido a la misma composición de oligosacáridos (figura 8B).

La digestión de los glicanos, liberados con PNGasaF, con endoglicosidasa H genera nuevas estructuras, estando el pico principal desplazado desde m/z 1664 a 1460 (figura 7B). La diferencia se corresponde con la masa de un resto GlcNAc. Tal como se mencionó anteriormente, la EndoH no puede romper los oligosacáridos de tipo complejo. Por tanto, el pico principal a m/z 1664 puede asignarse al tipo híbrido bisectado no fucosilado después de la digestión con endoglicosidasa H.

Otros picos pueden asignarse a glicanos bisectados híbridos o complejos. A m/z 1810, después de la digestión con EndoH, el pico desapareció de forma que las estructuras pueden asignarse al tipo híbrido bisectado fucosilado. La resta de un GlcNAc y un resto fucosa (del resto GlcNAc de extremo reductor del núcleo  $\alpha$ -1,6 fucosilado) del pico de m/z 1810 genera una estructura de m/z 1460. A m/z 1502, la desaparición de este pico mediante digestión con EndoH (el resto GlcNAc eliminado) y la aparición de un pico a m/z 1298, demuestra que el pico 1502 puede asignarse a un tipo híbrido bisectado no fucosilado. A m/z 1647, la desaparición del pico después de la digestión con EndoH demuestra que este pico es una estructura híbrida bisectada fucosilada. La eliminación de un GlcNAc y un resto fucosa genera una estructura de m/z 1298. El pico a m/z 1826, un tipo híbrido bisectado no fucosilado, fue digerido por EndoH. Esto generó una estructura con m/z 1622. El pico a m/z 1053 después de la digestión con EndoH puede asignarse al tipo de alto contenido en manosa (1257 m/z), digerido con EndoH. El pico a m/z 1689 (complejo bisectado) no fue afectado por la digestión con EndoH, tal como se esperaba. En resumen, a partir de los datos obtenidos en la tabla 1, los inventores concluyen que 88 % de las estructuras de los oligosacáridos portan un GlcNAc bisectante, 60 % de los cuales son estructuras híbridas bisectadas no fucosiladas, 22 % son híbridas bisectadas fucosiladas, y 6 % son estructuras de oligosacáridos bisectados complejos fucosilados.

Tabla 1. Asignaciones de los oligosacáridos

| m/z  | Posibles estructuras                         | % relativo antes de EndoH | m/z esperado después de EndoH | m/z observado después de EndoH | % relativo después de EndoH | Asignación  |
|--|--|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|
| 1256   | Alto contenido en manosa                     | 9                         | 1053                          | 1053                           | 11                          | Alto contenido en manosa (9 %)                      |
| 1502   | Híbrido no fuc. bisectado o Complejo no fuc. | 7                         | 1298 o 1502                   | 1298 -                         | 13                          | Híbrido no fuc. bisectado (7 %)                     |
| 1647   | Híbrido fuc. bisectado o Complejo fuc.       | 7                         | 1298 o 1647                   | 1298 -                         | 13                          | Híbrido fuc. bisectado (7 %)                        |
| 1664   | Híbrido no fuc. bisectado o Complejo no fuc. | 49                        | 1460 o 1664                   | 1460 -                         | 60                          | Híbrido no fuc. bisectado (49 %)                    |
| 1689   | Complejo fuc. bisectado                      | 3                         | 1689                          | 1689                           | 5                           | Complejo fuc. bisectado (3 %)                       |
| 1810   | Híbrido fuc. bisectado o Complejo fuc.       | 15                        | 1460 o 1810                   | 1460 1810                      | 60 2                        | Híbrido fuc. bisectado (13 %) y Complejo fuc. (2 %) |
| 1826   | Híbrido no fuc. bisectado                    | 4                         | 1622                          | 1622                           | 7                           | Híbrido no fuc. bisectado (4 %)                     |
| 1851   | Complejo fuc. bisectado                      | 3                         | 1851                          | 1851                           | 2                           | Complejo fuc. bisectado (3 %)                       |
| 1972   | Híbrido fuc. bisectado                       | 3                         | 1622                          | 1622                           | 7                           | Híbrido fuc. bisectado (3 %)                        |
| Equilibrios de masas (en fracción molar en %):   |  |                           |                               |                                |                             |   |
| a) Picos a m/z 1502 y 1647: $7 + 7 \% = 14 \%$ (esperado). La digestión con EndoH para ambos picos generó m/z 1298 (13 % obtenido después de EndoH). |  |                           |                               |                                |                             |   |
| b) Picos a m/z 1664 y 1810; $49 + 3 \% = 62 \%$ . Endow genera m/z 1460 (60 % obtenido)  |  |                           |                               |                                |                             |   |
| c) Picos a m/z 1826 y 1972: $4 + 3 \% = 7 \%$ . EndoH genera m/z 1622 (7 %)  |  |                           |                               |                                |                             |   |

## Resumen.

Porcentaje relativo total de las estructuras que porta un GlcNAc bisectante:

híbrido no fucosilado bisectado:

híbrido fucosilado bisectado:

complejo fucosilado bisectado:

88 %

60 %

22 %

6 %

Los anteriores datos (figuras 1 a 6) demuestran el nivel de expresión de GnTIII y el dominio de localización particular que se emplea para dirigir el dominio catalítico de GnTIII a Golgi, la influencia de la competencia por los sustratos de oligosacáridos modificados con GnTI entre el dominio catalítico de GnTIII recombinante y el núcleo endógeno de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa, las enzimas ManII y GnTII. La mayor expresión de GnTIII lo favorece en esta competencia, conduciendo a unos niveles mayores de oligosacáridos híbridos bisectados y bisectados, no fucosilados, y a una reducción concomitante de los niveles de oligosacáridos complejos bisectados y bisectados, fucosilados. Esto también se había advertido previamente en el GnTIII de tipo salvaje (Umana, P. et al., Nature Biotechnol., 17:176-180 (1999)). No obstante, a pesar de conducir a niveles similares globales de oligosacáridos bisectados, la localización del dominio catalítico de GnTIII a través de GnTI o a través de los dominios de localización de ManII conduce a una competencia más eficaz, con relación a la GnTIII de tipo salvaje, para los sustratos de oligosacáridos modificados genéticamente con GnTI frente al núcleo endógeno de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa, las enzimas ManII y GnTII.

La mayor eficacia de la fusión de GnTI-GnTIII, comparado con la GnTIII de tipo salvaje, para la síntesis de oligosacáridos híbridos bisectados, y bisectados, no fucosilados, puede explicarse por una distribución más temprana en Golgi, en la dirección cis a trans del transporte del sustrato de glicoproteína, de GnTI con relación a GnTIII. Las distribuciones precisas en Golgi de GnTI y ManII se han determinado previamente mediante microscopía de inmunoelectrones cuantitativa (Rabouille, C. et al., J. Cell Sci., 108:1617-1627 (1995)). Ambas enzimas se codistribuyen a lo largo del Golgi, estando localizadas principalmente en las cisternas media y trans del apilamiento del Golgi, con unos niveles mayores en la cisterna media con relación a la cisterna trans. Las precisas distribuciones espaciales cuantitativas del núcleo de  $\alpha$ 1,6-glucosiltransferasa, GnTII, y GnTIII de tipo salvaje aún no se han determinado. Sin embargo, lo anterior no explica por qué la fusión de ManII-GnTIII es significativamente más eficaz que la fusión de GnTI-GnTIII para la síntesis de oligosacáridos híbridos bisectados, y bisectados, no fucosilados, puesto que GnTI y ManII tienen idénticas distribuciones espaciales a lo largo de los subcompartimentos del Golgi.

La mayor eficacia de la fusión de ManII-GnTIII indica la existencia de subcompartimentos de reacción de glicosilación funcional relativamente organizados dentro de los subcompartimentos físicos de las cisternas media y trans del Golgi. Se cree que las denominadas "enzimas de glicosilación de Golgi medio", GnTI, GnTII y ManII existen en el Golgi como complejos de alto peso molecular. Sin embargo, si los dominios de localización permiten que estas enzimas formen

parte de estos complejos, esto debería ser igual para las fusiones de GnTI-GnTIII y ManII-GnTIII. La expresión de la fusión de GnTI-GnTIII recombinante no conduce al desplazamiento de la enzima GnTI de tipo salvaje endógena en ningún grado significativo para la síntesis de oligosacáridos-Fc, puesto que todos los constructos de GnTIII empleados en la presente conducen a que una mayoría de los oligosacáridos sean modificados por reacciones de GnTI y de GnTIII.

Los datos de los inventores indican que, en virtud del dominio de localización de ManII, se produce un apareamiento funcional más preciso entre los dominios catalíticos de la GnTI endógena y la fusión de ManII-GnTIII recombinante. Se sabe que en otras vías biosintéticas se producen apareamientos organizados de enzimas que catalizan reacciones posteriores en una vía biosintética, de forma que se favorece la transferencia del producto de la primera reacción al segundo sitio catalítico con relación a la difusión de dicho producto para alejarlo de las enzimas, como en la glicólisis y la biosíntesis de poliquetida. Se ha indicado que GnTI y ManII forman "oligómeros emparentados", al menos cuando una de estas enzimas se relocaliza en el retículo endoplasmático (Nilsson, T. et al., EMBO J., 13(3):562-574 (1994)). Se ha descubierto que un par de restos aminoácidos cargados en cada una de las regiones troncales de estas dos enzimas son críticos para este reconocimiento de parentesco. Los restos en GnTI tienen una carga opuesta a los de ManII. Los inventores han identificado restos similares en posiciones equivalentes de las regiones troncales de otras enzimas de glicosilación de Golgi implicadas en esta parte de la vía biosintética de oligosacáridos N-enlazados, a saber, el núcleo de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa (las mismas cargas que en GnTI en lugar de cargas complementarias como en el caso de la ManII), ManI y GnTII. También han descubierto que estos restos se conservan a través de las especies. Aunque se ha sugerido que estos restos no son fundamentales para la incorporación en los complejos de alto peso molecular formados por las enzimas o incluso para la localización en Golgi (Opat, A.S. et al., J. Biol. Chem., 275(16):11836-11845 (2000)), es posible que estén implicados en un apareamiento más preciso de los dominios catalíticos durante la biosíntesis de oligosacáridos. No es necesario que este apareamiento sea irreversible, sino que puede estar mediado por interacciones transitorias y dinámicas entre las enzimas. Podría haber otros determinantes para el apareamiento en otra parte de la región troncal o catalítica. Sin embargo, cualquier contribución a un apareamiento de GnTI-ManII específico por el dominio catalítico de ManII se perdería en la fusión recombinante que porta el dominio catalítico de GnTIII.

Las figuras 9 a 11 demuestran una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que resulta de la sobreexpresión en las células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII que se localiza en Golgi a través de dominios de localización diferentes. Una mayor ADCC como resultado de la expresión del polipéptido recombinante con actividad GnTIII y localizado en Golgi a través del dominio de localización en Golgi de GnTI se muestra en la figura 9. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo control empleado para el ensayo de ADCC de la figura 9 se muestra en la figura 1. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo glicomodificado genéticamente empleado para el ensayo de ADCC de la figura 9 se muestra en la figura 3. La mayor ADCC que resulta de la expresión del polipéptido recombinante con actividad GnTIII y localizado en Golgi a través del dominio de localización en Golgi de una glicosidasa, ManII, se muestra en la figura 10. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo control utilizado para el ensayo de ADCC de la figura 10 se muestra en la figura 5. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo glicomodificado genéticamente utilizado para el ensayo de ADCC de la figura 10 se muestra en la figura 6.

La figura 11 muestra que la expresión de un polipéptido recombinante con actividad GnTIII y localizado en Golgi a través del dominio de localización en Golgi de ManII conduce a una mayor actividad ADCC con relación al uso del polipéptido GnTIII de tipo salvaje con su propio dominio de localización en Golgi de GnTIII. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo glicomodificado genéticamente mediante la expresión de GnTIII de tipo salvaje y utilizado para el ensayo de ADCC de la figura 11 se muestra en la figura 2. El perfil de oligosacáridos del anticuerpo glicomodificado genéticamente mediante la expresión del polipéptido de fusión con actividad GnTIII, localizado en Golgi a través del dominio de localización de ManII, y utilizado para el ensayo de ADCC de la figura 11 se muestra en la figura 4. Estos datos también demuestran que los anticuerpos con oligosacáridos bisectados, incluyendo oligosacáridos híbridos bisectados, y bisectados, no fucosilados, tienen mayor actividad ADCC comparados con anticuerpos con oligosacáridos complejos, fucosilados, no bisectados. Debe advertirse que todos los oligosacáridos bisectados del anticuerpo más activo utilizado en el ensayo de ADCC de la figura 10 son oligosacáridos híbridos bisectados, no fucosilados. Tal como se mencionó previamente, el uso del polipéptido de fusión con actividad GnTIII y localizado en Golgi a través del dominio de localización de ManII, conduce a la síntesis más eficaz de los oligosacáridos bisectados, no fucosilados, y la figura 11 demuestra que los anticuerpos con mayores niveles de estos oligosacáridos bisectados, no fucosilados son más activos en ADCC con relación a anticuerpos con niveles menores de estos oligosacáridos. El aumento en la actividad ADCC se correlaciona con aumentos en esta fracción de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, dentro de la población de oligosacáridos asociados a Fc, y se observan unos grandes aumentos cuando esta fracción es mayor que 15 % al 20 %.

Se sabe que las células asesinas naturales (NK) son importantes mediadores de la ADCC. Estas células portan sobre su superficie el receptor Fc $\gamma$  activante IIIA, también conocido como CD16a. La unión de la región Fc, de los anticuerpos unidos a la célula diana, a los receptores Fc $\gamma$ RIIIA sobre las células NK es fundamental para la reticulación de estos receptores sobre la célula NK y la posterior inducción de ADCC. Por tanto, es importante evaluar la unión de los anticuerpos producidos mediante los métodos descritos en la presente a los receptores de Fc, en particular a los receptores en la forma nativa en que son presentados por las células efectoras inmunológicas

humanas. La figura 12 demuestra que los anticuerpos glicomodificados genéticamente producidos por la expresión en células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII, tienen mayor afinidad de unión con el receptor de Fc activante humano FcgammaRIIIA. Tal como se mencionó anteriormente para los ensayos de ADCC, estos anticuerpos tienen mayores niveles de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, que resultan de la expresión en las células productoras de anticuerpos del polipéptido de fusión con actividad GnTIII. Las células NK utilizadas en este ensayo procedían de un donante de un genotipo que no expresa el receptor FcgammaRIIc sobre sus células NK (Metes, D. et al., *J. Immunol. Methods*, 258(1-2):85-95 (2001)). Por tanto, el único receptor de Fc sobre la superficie de estas células es el receptor activante FcgammaRIIIA. La figura 13 demuestra que el ensayo de unión mide la afinidad de unión específica a este receptor. Esto se demuestra mediante la competición con un fragmento de anticuerpo bloqueante específico de FcgammaRIII (fragmento Fab2 3G8).

Han surgido pruebas contundentes del impacto de la potenciación de la interacción de Fc-FcR sobre el resultado de la terapia antitumoral con anticuerpos, a partir de la correlación, encontrada entre pacientes con linfoma que reciben rituximab, entre la eficacia y el genotipo homocigótico del receptor FcgammaRIIIA de mayor afinidad (Cartron, G. et al., *Blood*, 99(3):754-758 (2002)). Este es el único parámetro que se ha descubierto que se correlaciona con una velocidad de respuesta objetiva fuertemente potenciada y una mayor proporción de respuestas moleculares. El aumento en la eficacia debido a la potenciación de las interacciones de FcgammaRIIIA-Fc puede derivarse de las funciones que realizan diversos tipos de células inmunológicas, incluyendo las células asesinas naturales (NK), los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas. La reticulación del receptor activante FcgammaRIIIA sobre células NK, macrófagos y monocitos, puede conducir a la lisis de células tumorales por ADCC (que está ampliamente considerado como el principal mecanismo de muerte dependiente de FcR in vivo) (Maloney, D.G. et al., *Semin. Oncol.*, 29(1, supl. 2):2-9 (2002); Amigorena S., *J. Exp. Med.*, 195(1):F1-3 (2002)) y también a la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (Hazenbos, W.L. et al., *J. Immunol.*, 161 (6):3026-3032( 1995); Reff, M.E. y Heard, C., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 40(1):25-35 (2001)) y a la liberación de citoquinas en la vecindad de células tumorales (Carson, W.E. et al., *Eur. J. Immunol.*, 31:3016-3025 (2001)). Estas citoquinas, a su vez, pueden conducir a efectos citotóxicos directos en las células tumorales, a efectos antiangiogénicos que inhiben el crecimiento tumoral mediante la privación de oxígeno y nutrientes, y a potenciar la presentación de antígenos tumorales como parte de una respuesta inmunológica mediada por células T activas contra las células tumorales. Las células dendríticas son fundamentales para la presentación de antígenos a células T, y la reticulación de FcgammaRIIIA sobre su superficie (por ejemplo, procedente de células tumorales unidas a anticuerpos que están muriendo, que fueron atacadas originariamente in vivo mediante ADCC) puede conducir a una potenciación de la maduración de células dendríticas, captación de antígenos y presentación a las células T, y al cebado cruzado de células T citotóxicas, siendo esto último un mecanismo potencialmente muy eficaz para activar la inmunidad antitumoral (Amigorena S., *J. Exp. Med.*, 195(1 ):F1-3 (2002); Kalergis, A.M. y Ravetch, J.V., *J. Exp. Med.*, 195(12):1653-1659 (2002); Selenko, N. et al., *J. Clin. Immunol.*, 22(3):124-130 (2002)). La reticulación de anticuerpos unidos a dianas celulares por los receptores de Fc sobre células efectoras inmunológicas también puede conducir a un aumento en la muerte directa de las células diana, por ejemplo, mediante apoptosis inducida por la reticulación mediada por anticuerpos de las moléculas de antígeno diana (Reff, M.E. y Heard, C., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 40(1):25-35 (2001); Cragg, M.S. et al., *Blood*, 101(3):1045-1052 (2003)). De todas estas células efectoras inmunológicas, únicamente las células NK poseen sólo FcgammaR activantes sobre su superficie. En los otros tipos de células, el FcgammaRIII activante está presente junto con el receptor FcgammaRIIb inhibitor, y la inducción de las funciones efectoras antitumorales se produce como resultado de un equilibrio positivo de las señales activantes frente a las inhibitoras.

La figura 15 demuestra que la mayor unión al receptor de Fc es selectiva para el receptor activante, comparado con el FcgammaRIIb inhibitor. Esta selectividad es importante para las funciones efectoras realizadas por células inmunológicas que no sean células NK, como se explicó anteriormente. Además, los aumentos en la unión logrados por la glicomodificación genética de la región Fc del anticuerpo, utilizando los métodos descritos en la presente, son mucho mayores que los observados en la naturaleza para donantes/pacientes con genotipo homocigótico de FcgammaRIIIA de mayor afinidad que reciben el anticuerpo no modificado patrón (figura 16) y que ya han sido asociados con una mayor eficacia de anticuerpos anticáncer (Cartron, G. et al., *Blood*, 99(3):754-758 (2002)).

El dominio de unión del receptor FcgammaRIIIB activante es casi idéntico al del FcgammaRIIIA. Por tanto, los anteriores datos también indican que los anticuerpos glicomodificados genéticamente descritos en la presente también pueden conducir a un aumento en las funciones efectoras mediadas por células efectoras que portan el FcgammaRIIIB, tales como células polimorfonucleares (PMN), incluyendo la liberación de productos tóxicos y fagocitosis (Reff, M.E. y Heard, C., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 40(1):25-35 (2001); Daeron, F.M., *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997); Ravetch, J.V. y Bolland S., *Annu. Rev. Immunol.*, 19:275-290 (2001)).

La figura 18 muestra el perfil de oligosacáridos de un anticuerpo anti-CD20 producido a partir de células BHK cultivadas en suspensión y modificadas para una expresión constitutiva de alto nivel del anticuerpo recombinante y de un polipéptido de fusión con actividad GnTIII. El perfil de oligosacáridos muestra unos mayores niveles de oligosacáridos híbridos bisectados y bisectados no fucosilados para el anticuerpo procedente de las células modificadas genéticamente con la fusión de GnTIII (véase también la tabla 2). Estas estructuras no se han encontrado en los anticuerpos no glicomodificados genéticamente producidos por células BHK no glicomodificadas (véase la figura 1). Las células modificadas que expresan la fusión de GnTIII muestran un crecimiento normal en suspensión y una buena productividad de anticuerpos.

En la tabla 2 se presentan los porcentajes relativos de los oligosacáridos del anticuerpo monoclonal glicomodificado genéticamente producido por la línea celular BHK-1502-28-11 estable.

Tabla 2. Porcentajes relativos de los picos obtenidos mediante MALDI/TOF-MS

|   | Pico (m/z) | Porcentaje relativo |
|---|------------|---------------------|
| 1   | 1257       | 2,5 %               |
| 2   | 1486       | 2,8 %               |
| 3   | 1647       | 6 %                 |
| 4   | 1664       | 22,30 %             |
| 5   | 1680       | 2,5 %               |
| 6   | 1689       | 4,8 %               |
| 7   | 1705       | 3 %                 |
| 8   | 1810       | 27,8 %              |
| 9   | 1826       | 10 %                |
| 10  | 1851       | 7,5 %               |
| 11  | 1972       | 9 %                 |
| 12  | 2012       | 1,75 %              |
| Total bisectados: 88,6 % (4+5+6+7+8+9+10+11+12)     |            |                     |
| Total no fucosilados bisectados: 37,8 % (4+5+7+9)   |            |                     |
| Total fucosilados bisectados: 50,8 % (6+8+10+11+12) |            |                     |
| Complejos bisectados: 17 % (6+7+10+12)              |            |                     |
| Híbridos bisectados: 71,6 % (4+5+8+9+11)            |            |                     |

- 5 El análisis de oligosacáridos muestra que 88,6 % de las estructuras porta un resto GlcNAc bisectante, 50,8 % están fucosiladas y 37,8 % están no fucosiladas. La digestión del oligosacárido liberado con PNGasaF con endoglicosidasa H demuestra que la mayoría de los picos obtenidos son de tipo híbrido bisectado (figura 29). La figura 20 muestra una mayor afinidad de unión del anticuerpo glicomodificado genéticamente, producido por la línea celular BHK-1502-28-11, por el receptor de Fc activante FcγRIIIA sobre células NK humanas. Las líneas celulares que crecen en suspensión y con expresión estable constitutiva de los genes de anticuerpos y del polipéptido de fusión de GnTIII son ideales para la producción a gran escala de anticuerpos terapéuticos. Utilizando métodos de modificación genética celular convencionales, la glicomodificación genética puede realizarse introduciendo el gen de fusión de GnTIII en una línea celular que contiene los genes de anticuerpos, o introduciendo los genes de anticuerpos en una línea celular que contiene el gen de fusión de GnTIII (una "línea celular de producción preglicomodificada"), o introduciendo el anticuerpo y los genes de fusión de GnTIII al mismo tiempo.

Un anticuerpo anti-CD20 producido en células modificadas genéticamente para un alto nivel de expresión del ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII y localizado en el Golgi a través del dominio de localización de ManII, se ensayó también para la lisis mediada por el complemento (CML), una función efectora diferente que no depende de los receptores de Fc sobre las células efectoras inmunológicas. La gran mayoría de los oligosacáridos de este anticuerpo glicomodificado genéticamente eran del tipo híbrido bisectado no fucosilado. Se observó una actividad CML reducida para este anticuerpo anti-CD20, comparado con el anticuerpo no modificado (figura 21). Para algunas aplicaciones, los anticuerpos con mayor ADCC pero con CML reducida pueden resultar deseables, por ejemplo para reducir los efectos secundarios, tales como la vasculitis en los vasos sanguíneos en el sitio tumoral, mediados por CML. Se han observado otros efectos secundarios significativos mediados por CML para la terapia con anticuerpos anti-CD20 (van der Kolk L.E. et al., Br. J. Haematol., 115(4):807-811 (2001)). Sin embargo, los anteriores perfiles de oligosacáridos también demuestran que es posible modificar genéticamente las células productoras de anticuerpos para que expresen el polipéptido de fusión de GnTIII a un nivel de expresión intermedio que conduce a unos niveles intermedios de oligosacáridos no fucosilados híbridos bisectados (más del 15 %), pero con una fracción significativa de oligosacáridos complejos dentro de la población de oligosacáridos de Fc del anticuerpo glicomodificado genéticamente. Estos oligosacáridos complejos se asocian con niveles normales, no reducidos, de CML. Por tanto, los datos indican que de esta manera pueden producirse anticuerpos con mayor ADCC, que deberían mantener unos niveles muy similares de actividad CML, comparado con anticuerpos no modificados.

- 35 Un segundo anticuerpo IgG quimérico, C225, también conocido como cetuximab, que reconoce el receptor del factor del crecimiento epidérmico humano (EGFR), se glicomodificó genéticamente mediante los métodos descritos en la presente. La figura 22 muestra los perfiles de oligosacáridos del anticuerpo anti-EGFR no modificado C225 y de la versión glicomodificada genéticamente del mismo anticuerpo. Éste último se produjo en células que expresaban un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII y que se localiza en Golgi a través de un



dominio de localización de ManII. La figura 23 muestra la mayor ADCC del anticuerpo anti-EGFR que resulta de esta glicosmodificación genética. Los anticuerpos glicosmodificados genéticamente producidos mediante los métodos descritos en la presente, y que tienen una mayor ADCC y una mayor afinidad de unión por los receptores activantes de Fc, son moléculas prometedoras para la terapia con anticuerpos del cáncer y de enfermedades autoinmunitarias, puesto que deberían conducir a una mayor eficacia, con relación a la correspondiente versión no modificada (no glicosmodificada) de estos anticuerpos, para estas terapias. Además, debería ser posible reducir las dosis terapéuticas para los anticuerpos glicosmodificados genéticamente comparadas con los no modificados, y esto tendría un impacto positivo en el coste de la producción de anticuerpos.

#### EJEMPLO 2 (Comparativo)

Tratamiento de la trombocitopenia inmunomediada en un paciente con enfermedad del injerto frente al receptor crónica

La trombocitopenia autoinmunitaria en una enfermedad del injerto frente al receptor crónica representa un caso de desregulación de células B que conduce a una enfermedad clínica. Para tratar la trombocitopenia inmunomediada en un sujeto con enfermedad del injerto frente al receptor crónica, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 preparado según los métodos de la presente invención y que tiene una mayor ADCC se administra al sujeto según se describe en Ratanatharathom, V. et al., Ann. Intern. Med., 133(4):275-279 (2000) (cuyos contenidos completos se incorporan por la presente por referencia). De manera específica, se administra una infusión semanal de anticuerpo 375 mg/m<sup>2</sup> al sujeto durante 4 semanas. La terapia de anticuerpos produce una marcada disminución de células B en la sangre periférica y unos niveles menores de anticuerpos asociados a plaquetas.

#### EJEMPLO 3 (Comparativo)

Tratamiento de la anemia hemolítica y de la aplasia de eritrocitos pura inmunomediada grave

La aplasia de eritrocitos pura adquirida inmunomediada (PRCA) es un trastorno raro que se asocia con frecuencia a otros fenómenos autoinmunitarios. Para tratar la aplasia de eritrocitos pura adquirida inmunomediada en un sujeto, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 preparado según los métodos de la presente invención y que tiene una mayor ADCC se administra al sujeto según se describe en Zeeca, M. et al., Blood, 12:3995-3997 (1997) (cuyos contenidos completos se incorporan por la presente por referencia). De manera específica, un sujeto con PRCA y anemia hemolítica autoinmunitaria recibe dos dosis de anticuerpo 375 mg/m<sup>2</sup> semanales. Después de la terapia de anticuerpos se inicia un tratamiento sustitutivo con inmunoglobulina intravenosa. Este tratamiento produce una marcada disminución de células B en la sangre periférica y un significativo aumento en el recuento de reticulocitos acompañado de mayores niveles de hemoglobina.

#### EJEMPLO 4 (Comparativo)

##### Materiales y métodos

##### 1. Construcción de vectores de expresión de la fusión de GalT

##### Vector para la expresión constitutiva de GalT

Para la construcción del vector de expresión de GalT, se amplifica ADNc de GalT a partir de un banco de ADNc (Clontech) mediante PCR. Se añade un marcador de epítipo c-myc C-terminal inmediatamente cadena arriba del codón de fin del gen (secuencia de aminoácidos: PEQKLISEEDL) para la posterior detección conveniente de GalT mediante transferencias Western. Después de la confirmación de la secuencia correcta de GalT, el gen se insertó bajo el control del promotor MPSV y se añadió una señal de poliadenilación de beta-globina de conejo sintético. El vector de expresión de GalT final también contenía un módulo de resistencia a la puomicina distinto para la selección, estando el gen de resistencia a la puomicina también bajo el control del promotor MPSV y la señal de poliadenilación de beta-globina de conejo sintética.

Sustitución de aminoácidos que codifican el dominio de localización de GalT por aminoácidos que codifican el dominio de localización de la GnTI humana.

La construcción de este gen de galactosiltransferasa híbrido se realiza, por ejemplo, mediante reacciones de PCR solapantes, dando como resultado el plásmido que contiene la fusión de GnTI-GalT bajo el control del promotor MPSV y un módulo de resistencia a la puomicina para la selección.

##### Sustitución de aminoácidos que codifican el dominio de localización de GalT por aminoácidos que codifican el dominio de localización de la mannosidasa II humana

Se realiza la construcción del vector de expresión de GalT. El plásmido resultante contiene el gen manII-GalT híbrido bajo el control del promotor MPSV.

Combinación del gen de fusión híbrido manII-GalT con el origen de la replicación oriP del virus de Epstein-Barr

Se subclona un fragmento de ADN con oriP como se describe en el ejemplo 1, en el vector de expresión de ManII-GalT híbrido descrito anteriormente.

Combinación del gen de fusión de manII-GalT híbrido y un gen marcador de CD4 de la superficie celular truncada

El vector de expresión se modifica genéticamente para la expresión adicional de un gen marcador de CD4 de la superficie celular truncada. Brevemente, el módulo de expresión del gen de fusión de manII-GalT híbrido se convierte de un módulo de expresión monocistrónico a bicistrónico insertando, cadena abajo del codón de fin de la fusión de manII-GnTII, un elemento IRES del virus de la polio, seguido de un ADNc que codifica una proteína CD4 humana truncada (que comprende la secuencia conductora de CD4 humana para la secreción, seguida de los dominios transmembrana y extracelular).

3. Transfección de células de mamífero con los vectores de expresión de la fusión de GalT y de anticuerpos

Transfección de células BHK

Se cultivaron células en crecimiento exponencial (viabilidad 90-95 %), se recolectaron y posteriormente se transfectaron como se describe en el ejemplo 1. Para la producción de anticuerpos glicomodificados genéticamente, las células se cotransfectan con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos y el otro para la expresión del polipéptido de fusión de GalT, a una proporción de 3:1, respectivamente.

Transfección de células HEK293-EBNA

Se transfectaron células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial como se describe en el ejemplo 1. Para la producción de anticuerpos glicomodificados genéticamente, las células se cotransfectan con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos y el otro para la expresión del polipéptido de fusión de GalT, a una proporción de 4:1, respectivamente. En el día 5 después de la transfección, el sobrenadante se recolecta, se centrifuga durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvo a 4 °C.

Generación de una línea celular de mamífero estable que expresa un anticuerpo anti- CD20 recombinante y una fusión de GalT

El clon BHK-1502-28, que expresa constitutivamente genes de anticuerpo monoclonal anti-CD20 y el gen de resistencia a la neomicina, se transfecta con el vector de expresión mediante electroporación. El vector permite la expresión constitutiva del gen ManII-GalT y una forma truncada de CD4 humana, siendo esta última expresada de forma dependiente de IRES. El vector también contiene un módulo de expresión de un gen de resistencia a la puomicina. Los clones resistentes a puomicina primero se seleccionan para obtener un conjunto de clones que integran cromosómicamente el ADN del vector. Los clones entonces se seleccionan para la expresión en la superficie de CD4 truncada (tCD4), que actúa como marcador para el nivel de expresión de la unidad de expresión del gen ManII-GalT+tCD4 bicistrónica. Se verifica la producción de anticuerpos recombinantes de los clones seleccionados utilizando un ensayo ELISA.

La transfección y la posterior selección del nivel de expresión de tCD4 se realiza como se describió en el ejemplo 1.

4. Producción y purificación de anticuerpos no modificados y glicomodificados genéticamente

En el caso de células BHK transfectadas con un vector de expresión de anticuerpos o cotransfectadas con un vector de expresión de anticuerpos más un vector de expresión de la fusión de GalT, el sobrenadante del cultivo se recolecta después de cultivar las células transfectadas durante 96 h después de la transfección. Dependiendo de la productividad esperada, se realizan varias electroporaciones (1015) para el mismo vector.

En el caso de células HEK293-EBNA transfectadas con un vector de expresión de anticuerpos o cotransfectadas con un vector de expresión más un vector de expresión de la fusión de GalT, el medio de cultivo se reemplaza por medio de cultivo fresco aproximadamente 16 horas después de la transfección, y este último medio entonces se recolecta después de cultivar las células transfectadas durante 120 horas más.

Para la línea celular BHK-1502-28-11 estable, un cultivo se siembra a 500.000 células/ml y el sobrenadante se recolecta después de 4 días de cultivo.

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales se purifican del sobrenadante del cultivo utilizando dos etapas cromatográficas secuenciales. La cromatografía de proteína A y la cromatografía de intercambio catiónico se describen en el ejemplo 1.

## 5. Análisis de los oligosacáridos

Los oligosacáridos se liberan enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, estando los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución.

La solución de digestión resultante que contiene los oligosacáridos liberados se prepara directamente para un análisis MALDI/TOF-MS o se vuelve a digerir con la glicosidasa EndoH antes de la preparación de las muestras para el análisis MALDI/TOF-MS. El método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos inmovilizados en membranas de PVDF, y el método de liberación de oligosacáridos en solución se realizaron como se describió en el ejemplo 1.

### Uso de la digestión con endoglicosidasa H de oligosacáridos liberados con PNGasaF para la asignación de estructuras de oligosacáridos galactosilados híbridos a picos de oligosacáridos neutros de MALDI/TOF-MS

Los oligosacáridos liberados con PNGasaF posteriormente se digieren con endoglicosidasa H (EC 3.2.1.96) como se describió en el ejemplo 1.

### MALDI/TOF-MS

Las muestras que contenían los digeridos enzimáticos que contienen los oligosacáridos liberados se preparan y posteriormente se ensayan en un espectrómetro de masas MALDI/TOF-MS como se describió en el ejemplo 1.

## 6. Preparación y aislamiento de células

Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO 63178, EEUU) siguiendo fundamentalmente las instrucciones del fabricante y el protocolo descrito en el ejemplo 1.

Se aíslan células NK humanas a partir de PBMC aplicando un procedimiento de selección negativa como se describió en el ejemplo 1.

## 8. Ensayo de ADCC

Se preparan células PBMC o NK como células efectoras como se describió anteriormente, y se ensayan para determinar su capacidad para mediar en la citotoxicidad en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) según se describió en el ejemplo 1.

## 9. Unión de FcγRIIIA sobre células NK y unión de FcγRIIb sobre células de linfoma Raji

Se determinó la unión de FcγRIIIA sobre células NK recién aisladas y la unión de FcγRIIb sobre células de linfoma Raji como se describió en el ejemplo 1.

## 10. Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento

Se realizaron ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento utilizando diluciones de anticuerpos según el método descrito en el ejemplo 1

### Resultados y análisis

Se realizan ensayos para demostrar el impacto de la expresión de genes que codifican polipéptidos con actividad GalT sobre la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de anticuerpos, con relación a células que no producen dichos polipéptidos.

Los anticuerpos purificados se analizan para sus patrones de glicosilación mediante MALDI/TOF-MS como se describió en el ejemplo 1. Utilizando esta técnica es posible determinar la fracción de diferentes especies de oligosacáridos dentro de la población de oligosacáridos-Fc total original, y también es posible asignar estructuras a diferentes picos en el espectro (Umana, P. et al., Nature Biotechnol., 17:176-180 (1999)).

Se determina el perfil de oligosacáridos de anticuerpos no modificados. De modo específico, se determina si la modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la expresión de GalT de tipo salvaje conduce principalmente a oligosacáridos biantenarios complejos de núcleo fucosilado y galactosilados. También se determina si la modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de GnTI-GalT, en el que el dominio catalítico de GalT se localiza a través del dominio de localización en Golgi de GnTI, conduce principalmente a oligosacáridos biantenarios complejos galactosilados, con relación a la GalT de tipo salvaje. Si se sintetizan estructuras híbridas galactosiladas, no fucosiladas y galactosiladas, éstas pueden resultar de la competencia entre GalT y otras glicosiltransferasas o glicosidasas. Se espera que cuando se modifica un oligosacárido con una galactosa añadida a través de una reacción catalizada por GalT, la

$\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa del núcleo, Golgi de  $\alpha$ -manosidasa II (ManII) y GnTII ya no pueden actuar para modificar genéticamente los oligosacáridos galactosilados.

Una digestión con la glicosidasa EndoH, que puede distinguir entre oligosacáridos híbridos y complejos, se emplea para evaluar la proporción de oligosacáridos híbridos galactosilados, no fucosilados y galactosilados, unidos a Fc.

Se realizan ensayos para determinar si la modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GalT, en el que el dominio catalítico de GalT se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, conduce principalmente a híbridos oligosacáridos galactosilados, no fucosilados y galactosilados. De modo específico, se determina si, con relación a la GalT de tipo salvaje y a la fusión de GnTI-GalT, la fusión de ManII-GalT es más eficaz en la síntesis de oligosacáridos híbridos Fc galactosilados, no fucosilados y galactosilados, unidos a Fc.

Tal como se mencionó anteriormente, se emplea la endoglicosidasa H (EndoH) para confirmar la asignación de estructuras híbridas galactosiladas, no fucosiladas y galactosiladas a los diferentes picos de oligosacáridos observados en los perfiles MALDI. De los restos galactosa de los oligosacáridos que portan un resto galactosa, se determinan los porcentajes de estas estructuras que son estructuras híbridas no fucosiladas, oligosacáridos híbridos fucosilados y complejos fucosilados.

Se determina el impacto del nivel de la expresión de GalT y el dominio de localización particular que se emplea para dirigir el dominio catalítico de GalT al Golgi, sobre la competencia por los sustratos de oligosacáridos modificados con GnTI entre el dominio catalítico de GalT recombinante y las enzimas  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa del núcleo endógena, ManII y GnTIII. Se determina el nivel de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que resulta de la sobreexpresión en células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GalT que se localiza en el Golgi a través de diferentes dominios de localización.

También se determina si los anticuerpos glicomodificados genéticamente producidos mediante la expresión en las células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GalT tiene mayor afinidad de unión al receptor de Fc activante Fc $\gamma$ RIIIA humano o al Fc $\gamma$ RIIb inhibidor.

Los constructos de GalT competirán satisfactoriamente con la actividad de la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa del núcleo endógena, glicomodificando la región Fc de un anticuerpos y, por consiguiente, aumentando la ADCC.

Se determina el perfil de oligosacáridos de un anticuerpo anti-CD20 producido a partir de células BHK cultivadas en suspensión y modificado para la expresión constitutiva en alto nivel del anticuerpo recombinante y de un polipéptido de fusión con actividad GalT. Los porcentajes relativos de los oligosacáridos del anticuerpo monoclonal glicomodificado genéticamente producido por la línea celular BHK-1502-28-11 estable también se determinan.

## EJEMPLO 5 (Comparativo)

### Materiales y métodos

#### 1. Construcción de los vectores de expresión de ManII y GnTII

Para la construcción del vector de expresión de ManII, se subclonó un ADNc de la manosidasa II humana (SEC ID N°: 17) en un plásmido de vector de expresión cadena abajo del promotor MPSV y cadena arriba de una señal de poliadenilación de beta-globina de conejo sintética. Para la expresión de GnTII, se emplea un plásmido de vector de expresión con el ADNc de la GnTII humana subclonado cadena abajo del promotor/potenciador de CMV y cadena arriba de una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina.

#### Combinación de los vectores de expresión con el origen de la replicación oriP del virus de Epstein-Barr

Un fragmento de ADN con oriP se subclonó como se describió en el ejemplo 1 en el vector de expresión de ManII descrito anteriormente para producir el vector de expresión de ManII pCLF9. Un fragmento de ADN con oriP se subclonó como se describió en el ejemplo 1 en el vector de expresión de GnTII descrito anteriormente para producir el vector de expresión de GnTII pGnTII.

#### 2. Transfección de células HEK293-EBNA

Se transfectaron células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial como se describió en el ejemplo 1. Para la producción del anticuerpo no modificado "Cwt", las células se transfectaron con un vector de expresión de anticuerpos (pETR1520). Para la producción del anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cbrf", las células se cotransfectaron con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520) y otro para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519) a una proporción de 4:1, respectivamente. Para la producción del anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cm", las células se cotransfectaron con tres plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520), uno para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519), y otro para la expresión de

manosidasa II (pCLF9) a una proporción de 3:1:1, respectivamente. Para la producción del anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cmg", las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520), uno para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519), uno para la expresión de manosidasa II (pCLF9), y otro para la expresión de GnTII (pGnTII) a una proporción de 4:0,33:0,33:0,33, respectivamente.

### 3. Producción y purificación de anticuerpos no modificados y glicomodificados genéticamente

El medio de cultivo de las células transfectadas anteriores se reemplazó por medio de cultivo fresco aproximadamente 16 horas después de la transfección y este último medio entonces se recolectó después de cultivar las células transfectadas durante 120 horas más. Los sobrenadantes recolectados se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvieron a 4 °C.

#### Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo utilizando dos etapas cromatográficas secuenciales, una cromatografía de proteína A y una cromatografía de intercambio catiónico como se describió en el ejemplo 1. Para los anticuerpos cwt7, cbrt5 y cml, se añadió otra etapa de cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) y solución salina tamponada con fosfato después de la etapa de intercambio catiónico, y se recogió el pico del anticuerpo monomérico.

### 4. Análisis de oligosacáridos

Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos en solución mediante una digestión con PNGasaF como se describió en el ejemplo 1.

#### Uso de la digestión con endoglicosidasa H de oligosacáridos liberados con PNGasaF para la asignación de estructuras de oligosacáridos bisectados híbridos a picos de oligosacáridos neutros de MALDI/TOF-MS.

Los oligosacáridos liberados con PNGasa posteriormente se digirieron con endoglicosidasa H (EC 3.2.1.96) como se describió en el ejemplo 1.

#### MALDI/TOF-MS

Las muestras que contienen los digeridos enzimáticos que contienen los oligosacáridos liberados se prepararon y posteriormente se ensayaron en un espectrómetro de masas MALDI/TOF-MS como se describió en el ejemplo 1.

### 5. Preparación y aislamiento de células

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178, EEUU) siguiendo fundamentalmente las instrucciones del fabricante y el protocolo descrito en el ejemplo 1.

### 6. Aislamiento de células NK

Se aíslan células NK humanas a partir de PBMC aplicando un procedimiento de selección negativa como se describió en el ejemplo 1.

### 7. Ensayo de ADCC

Se prepararon células PBMC como células efectoras como se describió anteriormente, y se ensayaron para determinar su capacidad para mediar en la citotoxicidad en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) según se describió en el ejemplo 1.

### 8. Unión de FcγRIIIA sobre células NK

Se determinó la unión de FcγRIIIA sobre células NK recién aisladas y la unión de FcγRIIb como se describió en el ejemplo 1.

### 9. Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento

Se realizaron ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento utilizando diluciones de anticuerpos según el método descrito en el ejemplo 1, con la siguiente modificación genética para la preparación de la fuente de complemento humana. Brevemente, se preparó suero humano normal (NHS) a partir de sangre de voluntarios sanos. Se dejó que la sangre coagulase durante una hora y después se centrifugó a 1200 g durante 20 min. Se prepararon partes alícuotas del suero del sobrenadante exento de células y se conservaron a -80 °C. Se empleó NHS al 20 % del

volumen final del ensayo.

## Resultados y análisis

- 5 Se produjeron versiones glicomodificadas genéticamente de un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 (anticuerpo quimérico C2B8, también conocido como rituximab) cotransfectando cultivos de células de mamífero con vectores para la expresión de genes de anticuerpos y con vectores para la expresión de genes que codifican polipéptidos con actividad GnTIII y manosidasa II. También se preparó otra versión del anticuerpo glicomodificado genéticamente cotransfectando cultivos de células de mamífero con vectores para la expresión de genes de anticuerpos y con
- 10 vectores para la expresión de genes que codifican polipéptidos con actividad GnTIII, actividad manosidasa II, y actividad GnTII. Para el anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cbtr", las células se cotransfectaron con dos plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520), y otro para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519). Para el anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cm", las células se cotransfectaron con tres plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520), uno para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519), y otro para la expresión de manosidasa II (pCLF9). Para el anticuerpo glicomodificado genéticamente "Cmg", las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, uno para la expresión de anticuerpos (pETR1520), uno para la expresión del polipéptido de fusión de GnTIII (pETR1519), uno para la expresión de manosidasa II (pCLF9), y otro para la expresión de GnTII (pGnTII). Se produjo una versión no modificada (no glicomodificada) del mismo anticuerpo, "Cwt", transfectando células de mamífero sólo con el vector para la expresión de genes de anticuerpos.
- 20 Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante cinco días, y los anticuerpos segregados recombinantes se purificaron del medio de cultivo. La expresión de genes que codifican polipéptidos con actividad GnTIII y ManII no produjo un efecto significativo sobre la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de anticuerpos, con relación a células que no producen dichos polipéptidos de glicosiltransferasa o glicosidasa.
- 25 Los anticuerpos purificados entonces se analizaron para sus patrones de glicosilación. Estos anticuerpos portan oligosacáridos N-enlazados unidos sólo al resto Asn297 de la región Fc de la IgG1 humana. Los oligosacáridos se retiraron enzimáticamente de los anticuerpos mediante una digestión con PNGasaF y posteriormente se analizaron mediante MALDI/TOF-MS. Utilizando esta técnica es posible determinar la fracción de diferentes especies de oligosacáridos dentro de la población de oligosacáridos-Fc total original, y también es posible asignar estructuras a diferentes picos en los espectros (Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17:176-180 (1999)).
- 30

La figura 26 muestra los perfiles de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos neutros del anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 C2B8 recombinante no modificado Cwt. Con respecto al anticuerpo no modificado previamente descrito en el ejemplo 1, figura 5, el Cwt tiene un perfil de oligosacáridos típico, con unos picos a proporciones m/z de 1485, 1648 y 1810 que son coherentes con oligosacáridos complejos, biantenarios, de núcleo fucosilado, con 0, 1 y 2 restos galactosa, respectivamente. La modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, conduce a la producción de un anticuerpo (Cbtr) en el que la mayoría de los oligosacáridos-Fc son híbridos bisectados, no fucosilados (véase la figura 27). Tal como se describe en el ejemplo 1, se empleó la endoglicosidasa H (EndoH) para confirmar la asignación de estructuras híbridas bisectadas, no fucosiladas y bisectadas, a los diferentes picos de oligosacáridos observados en los perfiles MALDI.

35

40

La modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la coexpresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, y un ácido nucleico que codifica ManII, conduce a la producción de un anticuerpo (Cm) en el que la mayoría de los oligosacáridos-Fc son complejos bisectados, no fucosilados (véase la figura 28). La modificación genética de células productoras de anticuerpos mediante la coexpresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, un ácido nucleico que codifica ManII, y un ácido nucleico que codifica GnTII, conduce a la producción de un anticuerpo (Cmg) en el que la mayoría de los oligosacáridos-Fc son complejos bisectados, no fucosilados, con una fracción de oligosacáridos unidos a Fc complejos bisectados, no fucosilados, aún mayor que la del anticuerpo Cm.

45

50

La figura 29 muestra los datos que demuestran una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que resulta de la expresión en células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de ManII-GnTIII, en el que el dominio catalítico de GnTIII se localiza a través del dominio de localización en Golgi de ManII, en el que el ácido nucleico que codifica ManII-GnTIII se expresa por sí solo (anticuerpo Cbtr) o se coexpresa en las células productoras de anticuerpos junto con un ácido nucleico que codifica ManII (Cm). Por tanto, aumentando el nivel de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, del tipo híbrido o complejo en la región Fc de los anticuerpos glicomodificados genéticamente conduce a una mayor actividad ADCC.

55

60

Se sabe que las células asesinas naturales (NK) son importantes mediadoras en la ADCC. Estas células portan sobre su superficie el receptor Fcγ activante IIIA, también conocido como CD16a. La unión de la región Fc, de los anticuerpos unidos a la célula diana, a los receptores FcγRIIIA sobre las células NK es fundamental para la reticulación de estos receptores sobre la célula NK y la posterior inducción de ADCC. Por tanto, es importante evaluar la unión de los anticuerpos producidos mediante los métodos descritos en la presente a los receptores de Fc, en

65

particular a los receptores en la forma nativa en que son presentados por las células efectoras inmunológicas humanas. La figura 30 demuestra que los anticuerpos glicomodificados genéticamente producidos por la expresión en células productoras de anticuerpos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII, expresados por sí solos (anticuerpo Cbrt) o coexpresados en las células productoras de anticuerpos junto con un ácido nucleico que codifica ManII (Cm), tienen mayor afinidad de unión con el receptor de Fc activante humano FcγRIIIA. Tal como se mencionó anteriormente para los ensayos de ADCC, estos anticuerpos tienen mayores niveles de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, que resultan de la expresión en las células productoras de anticuerpos del polipéptido de fusión con actividad GnTIII.

Por tanto, aumentando el nivel de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, del tipo híbrido o complejo en la región Fc de los anticuerpos glicomodificados genéticamente conduce a una mayor actividad ADCC. Las células NK utilizadas en este ensayo procedían de un donante de un genotipo que no expresa el receptor FcγRIIc sobre sus células NK (Metes, D. et al., *J. Immunol. Methods*, 258(1-2):85-95 (2001)). Por tanto, el único receptor de Fc sobre la superficie de estas células es el receptor activante FcγRIIIA.

El dominio de unión del receptor FcγRIIb activante es casi idéntico al del FcγRIIIA. Por tanto, los anteriores datos también indican que los anticuerpos glicomodificados genéticamente descritos en la presente pueden conducir a un aumento en las funciones efectoras mediadas por células efectoras que portan el FcγRIIb, tales como células polimorfonucleares (PMN), incluyendo la liberación de productos tóxicos y fagocitosis (Reff, M.E. y Heard, C., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 40(1):25-35 (2001); Daeron, F.M., *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997); Ravetch, J.V. y Bolland S., *Annu. Rev. Immunol.*, 19:275-290 (2001)).

El Cbrt, un anticuerpo anti-CD20 producido en células modificadas genéticamente para la expresión del ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII y localizado en el Golgi a través del dominio de localización de ManII, se ensayó también para la lisis mediada por el complemento (CML), una función efectora diferente que no depende de los receptores de Fc sobre las células efectoras inmunológicas. Una inmensa mayoría de los oligosacáridos de este anticuerpo glicomodificado genéticamente son de tipo híbrido bisectado no fucosilado. Se observó una actividad CML reducida para el anticuerpo Cbrt, comparado con el anticuerpo no modificado Cwt (figura 31). Para algunas aplicaciones, los anticuerpos con mayor ADCC pero con CML reducida pueden resultar deseables, por ejemplo para reducir los efectos secundarios, tales como la vasculitis en los vasos sanguíneos en el sitio tumoral, mediados por CML. Se han observado otros efectos secundarios significativos mediados por CML para la terapia con anticuerpos anti-CD20 (van der Kolk L.E. et al., *Br. J. Haematol.*, 115(4):807-811 (2001)). Sin embargo, es posible producir anticuerpos glicomodificados genéticamente con mayor actividad ADCC y unión a FcγRIII, pero sin reducir significativamente la actividad CML con relación al anticuerpo no modificado, como es el caso del anticuerpo Cm (figura 31). Estos anticuerpos serían deseables para aplicaciones en las que la máxima eliminación de células diana requiere una alta ADCC y una alta activación del complemento y actividad CML. Los perfiles de oligosacáridos descritos anteriormente demuestran que es posible modificar genéticamente las células para que produzcan anticuerpos en los que la mayoría de los oligosacáridos unidos a Fc son de tipo complejo bisectado, no fucosilado, en lugar de ser de tipo híbrido, coexpresando el polipéptido de fusión de GnTIII junto con un ácido nucleico que codifica ManII (anticuerpo Cm) o junto con un ácido nucleico que codifica ManII y con un ácido nucleico que codifica GnTII (anticuerpo Cmg). Los anticuerpos glicomodificados genéticamente tienen mayor actividad ADCC y mayor afinidad de unión por FcγRIII, que se correlaciona con sus mayores niveles de oligosacáridos bisectados, no fucosilados, mientras que su actividad CML aumenta a medida que aumenta la fracción de oligosacáridos complejos con relación a la fracción de oligosacáridos híbridos.

Este ejemplo y los ejemplos previos han descrito la expresión de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fusión, en la que el polipéptido de fusión se localiza en el complejo de Golgi y tiene un dominio catalítico que compite con fucosiltransferasas endógenas por aceptores de oligosacáridos previamente modificados mediante reacciones catalizadas por GnTI. Las glicoproteínas recombinantes producidas por dichas células hospedantes modificadas genéticamente tienen mayores niveles de oligosacáridos no fucosilados. Este ejemplo demuestra que la coexpresión en dichas células hospedantes de ácidos nucleicos que codifican ManII y/o GnTII junto con los anteriores ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fusión, conduce a un aumento en el flujo biosintético hacia oligosacáridos complejos, en lugar de híbridos y, por tanto, a la síntesis de glicoproteínas con mayores niveles de oligosacáridos complejos no fucosilados con relación a las glicoproteínas producidas en células que no coexpresan los ácidos nucleicos que codifican ManII y/o GnTII.

#### EJEMPLO 6 (Comparativo)

Sobreexpresión de α-manosidasa

Clonación molecular

#### α-manosidasa II humana

El gen que codifica la α-manosidasa II humana ("hManII") (E.C. 3.2.1.114) (SEC ID N°: 17), bajo el control del promotor MPSV, se clonó en un vector de expresión que contiene el elemento OriP. El vector de expresión resultante pCLF9 se

muestra en la figura 32A. Los vectores de expresión que codifican la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 fueron, respectivamente, pETR1842 y pETR1843 (figuras 32B y 32C).

#### Proteína de fusión de ManII-GalT

Se construyó una proteína de fusión (SEC ID N°: 20) que consistía en la CTS de hManII y el dominio catalítico de la  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa humana (M22912, aminoácidos 126-397) como se describe a continuación. La región CTS de hManII se amplificó mediante PCR a partir de pETR1484 (CF33, GAB252). El dominio catalítico de GalT (aminoácidos 126-397) se amplificó utilizando CF31 y CF35 de pBlueGalT. La CTS de hManII se combinó con el dominio catalítico de GalT para obtener una proteína de fusión controlada por el promotor MPSV (pCLF24). El gen GalT completo se obtuvo a partir de pBlueGalT. El gen que codifica GalT se secuenció (SEC ID N°: 16).

```
MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLRS
LPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDS
SPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSPLACPEESPLLVGPMLEFNMPVDL
ELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIPFRNRQEHLKYWLYYLLHP
VLQRQQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSDV
DLIPMNDHNA YRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALS KQQFLT
INGFPNNYWG WGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSRDKK
NEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLT YQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
```

El 5' de GalT se amplificó con CF32/CF38 y se añadió un sitio de restricción FseI enfrente del gen. Se determinó que la secuencia era correcta mediante secuenciación e intercambio en pCLF24 mediante digestión con FseI/DraIII (pCLF26). El OriP se añadió a pCLF24 y pCLF26 para generar, respectivamente, pCLF25 y pCLF27 (figuras 33A y 33B).

#### **Expresión de $\alpha$ -manosidasa y ManII-GalT en células HEK293-EBNA**

Se transfectaron células HEK293-EBNA con el método del fosfato de calcio. Brevemente, para la transfección de un T150, se sembraron 15 millones de células 24 horas antes de una transfección en 28 ml de DMEM, FCS al 10 %, neomicina 250  $\mu$ g/ml e incubación a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche.

Para cada matraz T150 que se va a transfectar, se preparó una solución de ADN, CaCl<sub>2</sub> y agua mezclando 94  $\mu$ g del ADN del vector plasmídico total, 469  $\mu$ l de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M, y añadiendo agua hasta un volumen final de 938  $\mu$ K A esta solución se le añadieron 938  $\mu$ l de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM a pH 7,05 y se mezcló inmediatamente durante 10 s y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluyó con 24 ml de DMEM suplementado con FCS al 2 % y se añadió al T150 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante aproximadamente 17 a 20 horas, y el medio se reemplazó por 30 ml de DMEM, FCS al 10 %.

Para ensayar el efecto de la manosidasa II sobre la competencia de la fucosiltransferasa del núcleo, las células se transfectaron con pETR1842, pETR1843, y pCLF9 a una proporción de 2:2:1, respectivamente. Para la proteína de fusión de ManII-GalT, las células se transfectaron con pETR1842, pETR1843 y pCLF25 a una proporción de 2:2:1, respectivamente. En el día 5 después de la transfección, el sobrenadante se recolectó, se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm, se filtró y se mantuvo a 4 °C.

#### **Purificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20**

El anticuerpo monoclonal se purificó a partir de 30 ml de sobrenadante mediante una cromatografía en dos etapas, que implica primero una cromatografía de proteína A, para separar el anticuerpo monoclonal del anticuerpo de vaca presente en el suero, seguido de una cromatografía de intercambio catiónico, para intercambiar el tampón de la muestra a PBS.

#### **Análisis de oligosacáridos**

##### Digestión con PNGasaF

La muestra de anticuerpo monoclonal (50  $\mu$ g) se incubó con N-glicosidasa F (recombinante, Roche, Suiza) a 0,1 mU/ $\mu$ K La digestión se realizó en tampón Tris 2 mM, pH 7,0, durante 3 horas a 37 °C. Los oligosacáridos neutros



liberados entonces se incubaron con ácido acético 150 mM durante 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras entonces se desalaron con 0,6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma de hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Hércules, CA) cargada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Hércules, CA).

## 5 Digestión con EndoH

Los oligosacáridos liberados con PNGaseF se digirieron con endoglicosidasa H (EC 3.2.1.96, ROCHE, Suiza), una enzima que rompe entre los restos N- acetilglucosamina del núcleo de quitobiosa de los oligosacáridos N-enlazados, antes del tratamiento con ácido acético. La enzima romperá la oligomanosa y la mayoría de los glicanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizarán.

Los oligosacáridos se digirieron con endoglicosidasa H 0,2 mU/μl en Tris 2 mM, pH 7,0. La digestión se realiza a 37 °C durante 3 horas. Los oligosacáridos se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente con ácido acético 150 mM y posteriormente se desalaron con 0,6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma de hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) cargada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza).

## Preparación de la matriz y de las muestras

La matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (sDHB) se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico + 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (en v/v). Se aplicó 1 μl de la muestra a una diana de acero inoxidable y se mezcló 1 μl de matriz sDHB. Las muestras se secaron al aire y se aplicaron 0,2 μl de etanol.

## Análisis MALDI/TOF-MS

El espectrómetro de masas MALDI/TOF utilizado para adquirir los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems) equipado con extracción retrasada. El instrumento se hizo funcionar en el modo reflector. Los iones positivos se aceleraron hasta 20 kV después de 75 ns de retraso. Se combinaron 5 espectros de 40 disparos (200 disparos) para obtener el espectro final. Se empleó una calibración externa empleando patrones de oligosacáridos para la asignación de masas de los iones.

## Perfil de oligosacáridos

El perfil de oligosacáridos del anticuerpo anti-CD20 producido en presencia de ManII se muestra en la figura 34. Los oligosacáridos que se descubrieron asociados a la porción Fc del anticuerpo son estructuras complejas, 48 % de las cuales carecían del núcleo de fucosa. La  $\alpha$ -manosidasa II compite con la fucosiltransferasa del núcleo, generando 48 % de estructuras de oligosacáridos no fucosilados. En ausencia de la  $\alpha$ -manosidasa II, los oligosacáridos de la porción Fc del anticuerpo están compuestos sólo de estructuras fucosiladas (anticuerpos de tipo salvaje).

El perfil de oligosacáridos de un anticuerpo anti-CD20 producido en presencia de la proteína de fusión de ManII-GalT se muestra en la figura 35A-B. Con respecto a la  $\alpha$ -manosidasa II, también en el caso de la proteína de fusión de ManII-GalT, la cantidad de estructuras de oligosacáridos no fucosilados aumenta. Un alto porcentaje de estructuras no fucosiladas consiste en estructuras con un alto contenido en manosa (m/z 1256, 1419 y 1581). Además de este 67 % de azúcares no fucosilados, se encontró 30 % de estructuras no fucosiladas híbridas (m/z 1622). Por tanto, la muestra producida en presencia de la proteína de fusión de ManII-GalT muestra casi 100 % de estructuras no fucosiladas.

## Actividad biológica de anticuerpos producidos en presencia de $\alpha$ -manosidasa II o de la proteína de fusión de ManII-GalT

Para determinar el efecto de la acción de la  $\alpha$ -manosidasa II y de la enzima ManII-GalT en la competencia de la fucosiltransferasa del núcleo, se realizaron ensayos biológicos pertinentes. Las muestras se ensayaron para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) in vitro y para la unión al receptor de CD16 expresado sobre la superficie de una línea de células CHO modificada genéticamente (CHO-1708-37).

## Unión de IgG sobre CHO-1708-37

La línea de células CHO-1708-37 expresa sobre su superficie el receptor FcγRIIIA (CD16) y la cadena  $\gamma$  del receptor FcγRI. La expresión del receptor FcγRIIIA (CD16) se evaluó mediante un análisis FACS utilizando el anticuerpo monoclonal 3G8- FITC (figura 36). Las células CHO-1708-37 se incubaron a 1 millón/ml en PBS, BSA al 0,1 % con diferentes variantes de anticuerpos, a diferentes concentraciones (10, 3, 1, 0,3, 0,1 μg/ml) y por triplicado. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C y posteriormente se lavaron con PBS, BSA al 0,1 %. Se detectó la unión de los anticuerpos incubando con F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 30 min a 4 °C. La intensidad de la fluorescencia con relación a los variantes de anticuerpos unidos se determinó en un FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA) con ventana de análisis para células vivas.

Se incluyeron los siguientes variantes de anticuerpos en el experimento de ensayo de unión:

Cwt8 (tipo salvaje 1)  
ManII ( $\alpha$ -manosidasa II)

El anticuerpo producido en presencia de  $\alpha$ -manosidasa II (ManII) se une al receptor Fc $\gamma$ RIIIA con mayor afinidad que los anticuerpos de tipo salvaje.

#### Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) in vitro

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178, EEUU) y: siguiendo fundamentalmente las instrucciones del fabricante. Brevemente, se extrajo sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios que había estado corriendo durante 1 minuto a toda potencia para aumentar el porcentaje de células asesinas naturales (NK) en la sangre. La sangre se diluyó 1:0.75-1,3 con PBS que no contenía Ca ni Mg, y se extendió sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente sin interrupciones. La interfase que contenía las PBMC se recogió y se lavó con PBS (50 ml por células de los dos gradientes) y se recolectó mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la resuspensión del sedimento con PBS, las PBMC se contaron y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se resuspendieron en el medio apropiado para los posteriores procedimientos.

Las células diana Raji se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en DMEM, FCS al 10 %, Glutamax al 1 % a 1 millón por ml. A esto se le añadió calceína 1:100 y las células se incubaron durante 30 min a 37 °C. Las células entonces se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0,3 millones por ml. De esta suspensión celular se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50  $\mu$ l a las células diana precultivadas en placa y se dejó que se uniesen a las dianas durante 10 min a temperatura ambiente. Se prepararon PMBC como células efectoras como se describió anteriormente. La proporción de células efectoras:diana era 25:1. Las células efectoras se prepararon a 15 millones por ml en medio AIM-V y se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron dos veces en PBS y se añadieron 200  $\mu$ l de solución borato. Se evaluó la muerte de las células diana midiendo la liberación de calceína en el medio después de la lisis con la solución de borato (figura 37).

Se midió la liberación espontánea de pocillos que contenían sólo células diana y efectoras pero sin anticuerpos. Se determinó la liberación máxima en los pocillos que contenían sólo células diana y Triton-X 100 al 1 %. Se calculó el porcentaje de muerte mediada por anticuerpos específicos como sigue:  $((x - LE)/(LM - LE)) \times 100$ , en que x es la media de Vmax a una concentración de anticuerpos específicos, LE es la media de Vmax de la liberación espontánea, y LM es la media de Vmax de la liberación máxima.

#### EJEMPLO 7 (Comparativo)

Uso del anticuerpo monoclonal anti-EGFR glicomodificado genéticamente para tratar la psoriasis

Pueden tratarse pacientes humanos con psoriasis con un anticuerpo monoclonal anti-EGFR glicomodificado genéticamente producido según los métodos de la invención. En particular, el paciente recibe infusiones semanales del anticuerpo glicomodificado genéticamente a una dosis de carga de 400 mg/m<sup>2</sup>. Se administran dosis de mantenimiento de 250 mg/m<sup>2</sup> semanales hasta que logra una respuesta completa.

#### EJEMPLO 8 (Comparativo)

Uso del anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 glicomodificado genéticamente para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico, el cáncer de mama metastásico, el cáncer colorrectal metastásico, y el cáncer de pulmón de células no pequeñas de etapa IIIb o IV

RhuMab 2C4 es un anticuerpo monoclonal humanizado de longitud completa (producido en células CHO) dirigido contra ErbB2. RhuMab 2C4 bloquea la asociación de ErbB2 con otros miembros de la familia ErbB, inhibiendo con ello la señalización intracelular a través de la vía de ErbB. RhuMab 2C4 no sólo inhibe el crecimiento de tumores que sobreexpresan ErbB2, sino que también bloquea el crecimiento de tumores que requieren una señalización dependiente del ligando de ErbB.

Una forma glicomodificada de RhuMab 2C4 preparada mediante los métodos de la presente invención puede utilizarse como único agente para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas (independiente de andrógenos), pacientes con cáncer de mama metastásico, pacientes con cáncer colorrectal metastásico y pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas de etapa IIIb o IV. De modo específico, el RhuMab 2C4 glicomodificado genéticamente se administra por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta que cesa el avance de la enfermedad. El anticuerpo se suministra como una formulación

líquida de múltiples dosis (carga de 20 ml a una concentración de 20 mg/ml o a una concentración mayor).

5 Quedará claro que la invención puede ponerse en práctica de modo diferente al descrito particularmente en la descripción y ejemplos anteriores. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de los anteriores contenidos y, por lo tanto, están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedante de mamífero o de levadura modificada genéticamente para que exprese:

(i) al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad manosidasa II (Man II); o  
 (ii) al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnT III, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad Man II y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT II);  
 en donde la célula hospedante está modificada genéticamente para que exprese dichos ácidos nucleicos en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula hospedante, en donde dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que retiene una región Fc funcional y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en donde dicho polipéptido de fusión que tiene actividad GnT III comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi, y en donde dicha célula hospedante de mamífero es una célula cultivada, o comprendida en tejido animal cultivado, o comprendida en un animal transgénico no humano.

2. La célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante muestra afinidad de unión aumentada al receptor Fc como resultado de dicha modificación genética.

3. La célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante muestra función efectora aumentada como resultado de dicha modificación genética.

4. La célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, unión a células NK aumentada, unión a macrófagos aumentada, unión a células polimorfonucleares aumentada, unión a monocitos aumentada, apoptosis inducida por señalización directa aumentada, maduración de células dendríticas aumentada o cebado de linfocitos T aumentado.

5. La célula hospedante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II,  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, manosidasa I,  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II o  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa de núcleo.

6. Un método para producir un polipéptido en una célula hospedante de mamífero o de levadura, que comprende:

(i) cultivar una célula hospedante modificada genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnT III y al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad ManII, y opcionalmente, al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnT II, en condiciones que permiten la producción de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una molécula de anticuerpo completa, un fragmento de anticuerpo que retiene una región Fc funcional y una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, en donde dicho polipéptido de fusión que tiene actividad GnT III, dicho polipéptido que tiene actividad Man II y dicho polipéptido que tiene actividad GnT II se expresan en una cantidad suficiente para modificar genéticamente los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante, y en donde el polipéptido de fusión que tiene actividad GnT III comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi, y  
 (ii) aislar dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha célula hospedante además se modifica genéticamente para que exprese al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnT II.

8. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en el que dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de GnT III.

9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de manosidasa II,  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, manosidasa I,  $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II o  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa de núcleo.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido tiene función efectora aumentada como resultado de dicha modificación genética.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido producido por dicha célula hospedante tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisectados, no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichos oligosacáridos bisectados, no fucosilados son híbridos o complejos.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 % o al menos un 35 % de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisectados, no fucosilados.

Figura 1

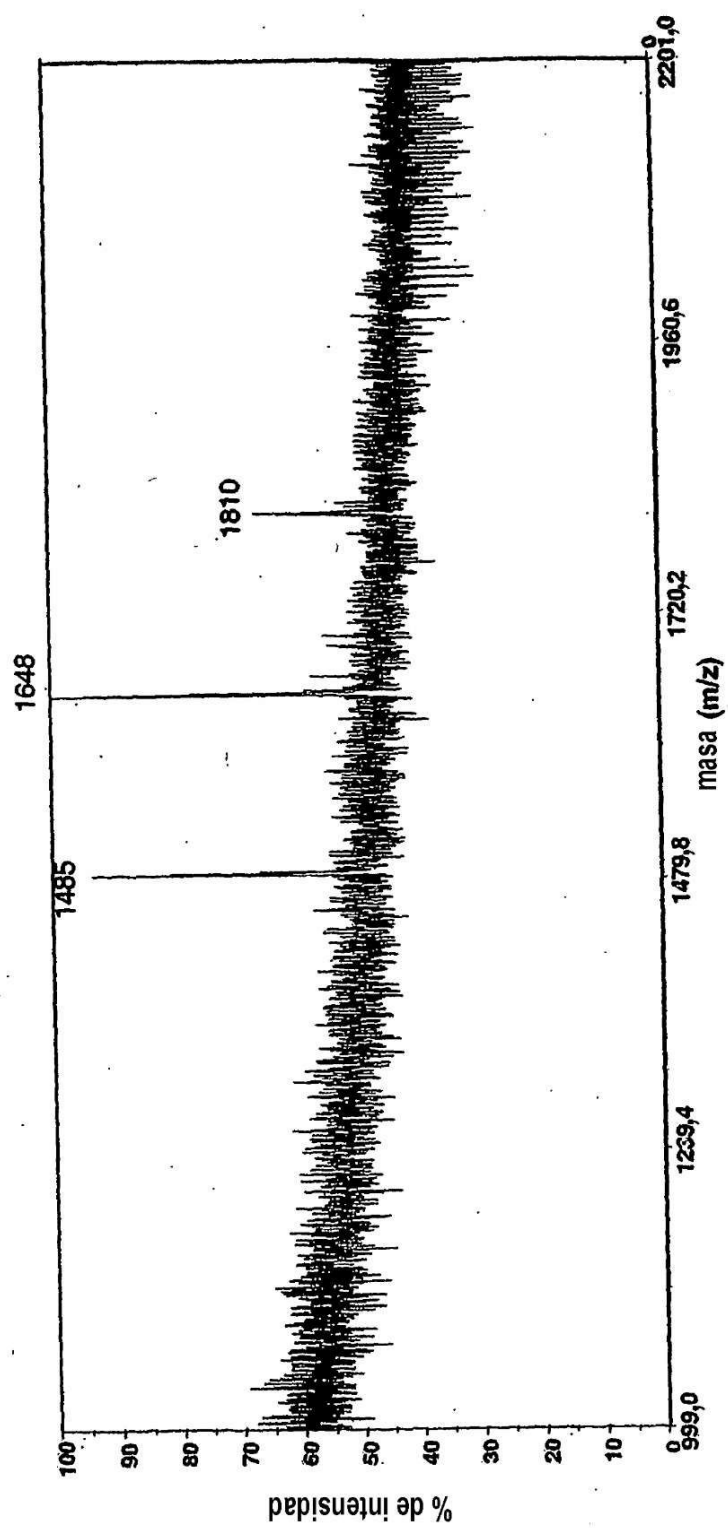


Figura 2

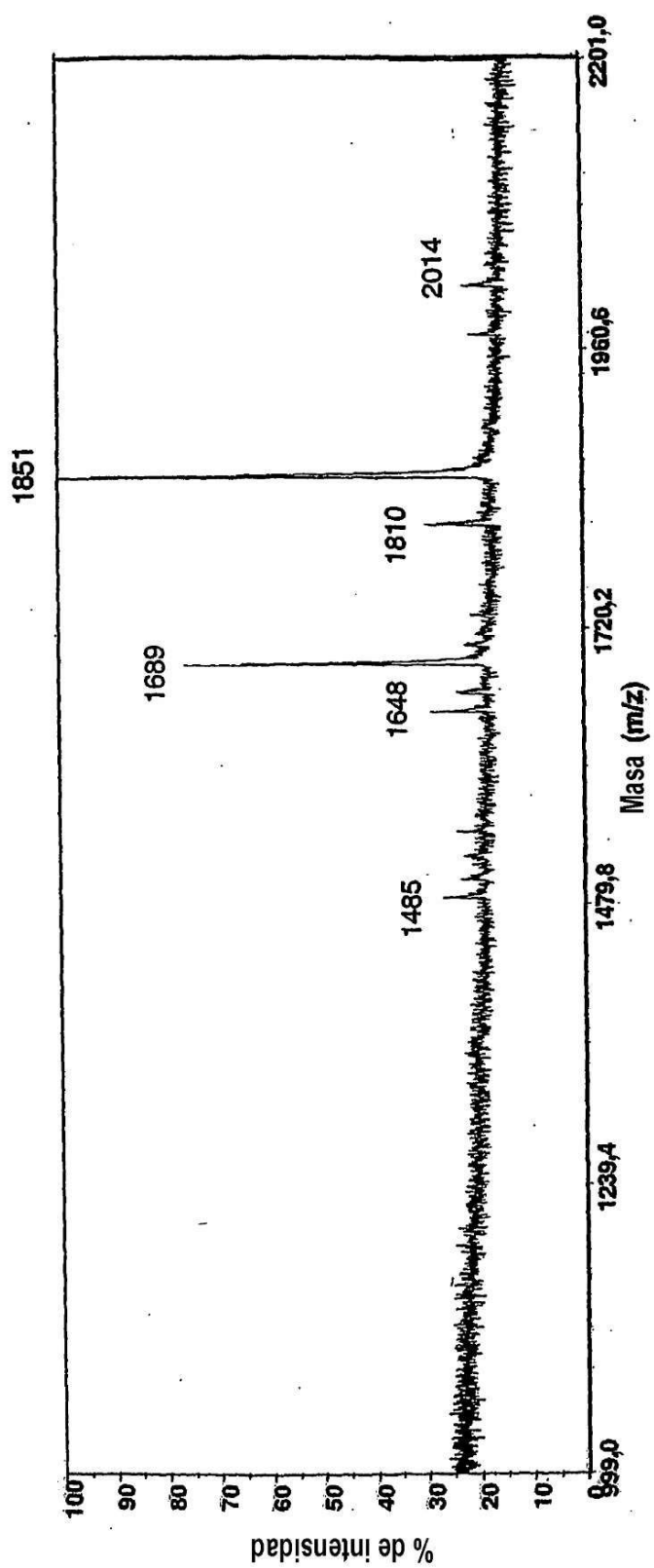


Figura 3

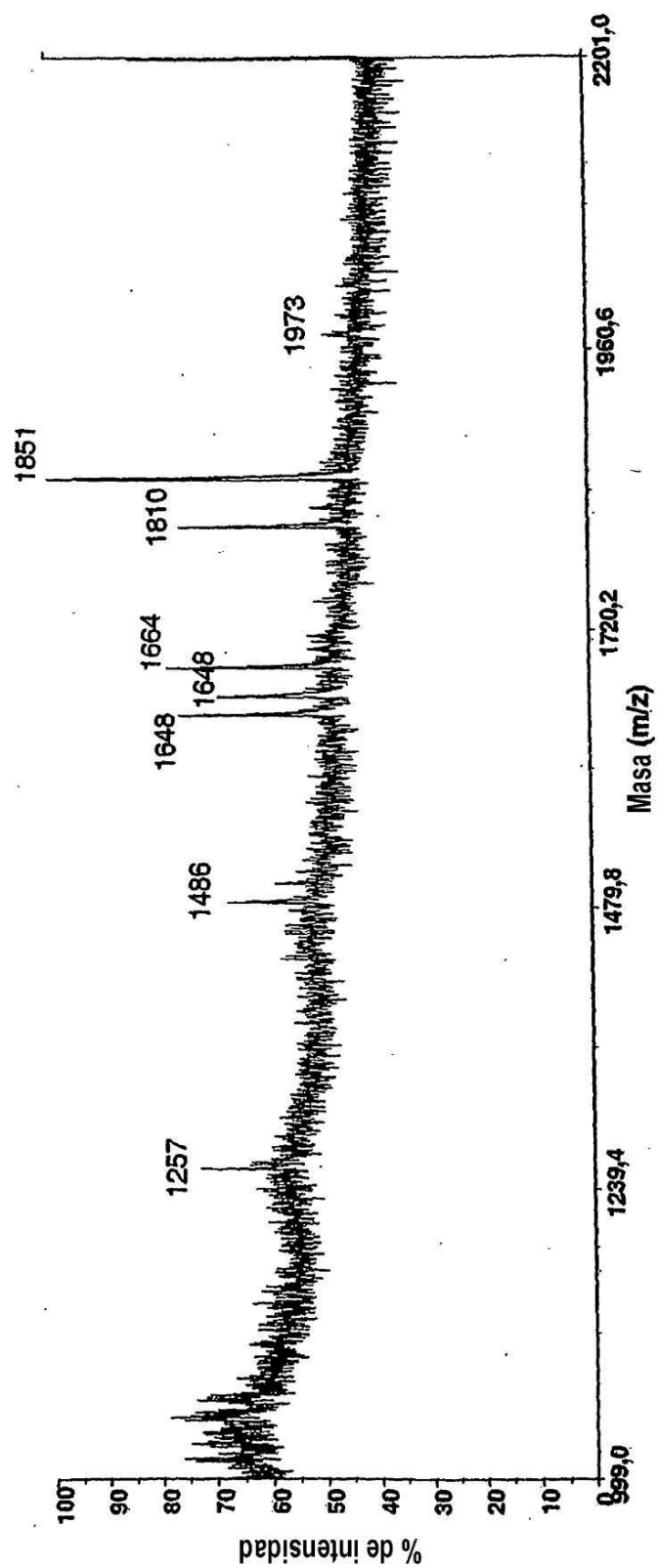




Figura 4

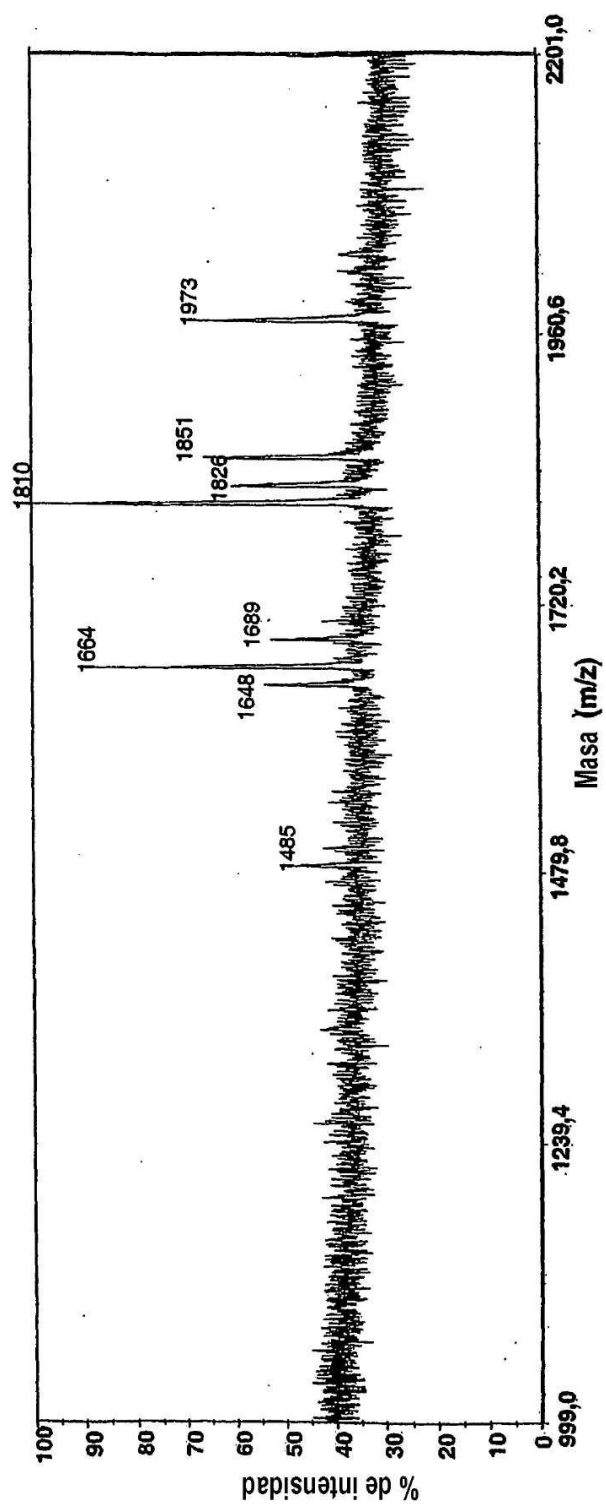


Figura 5

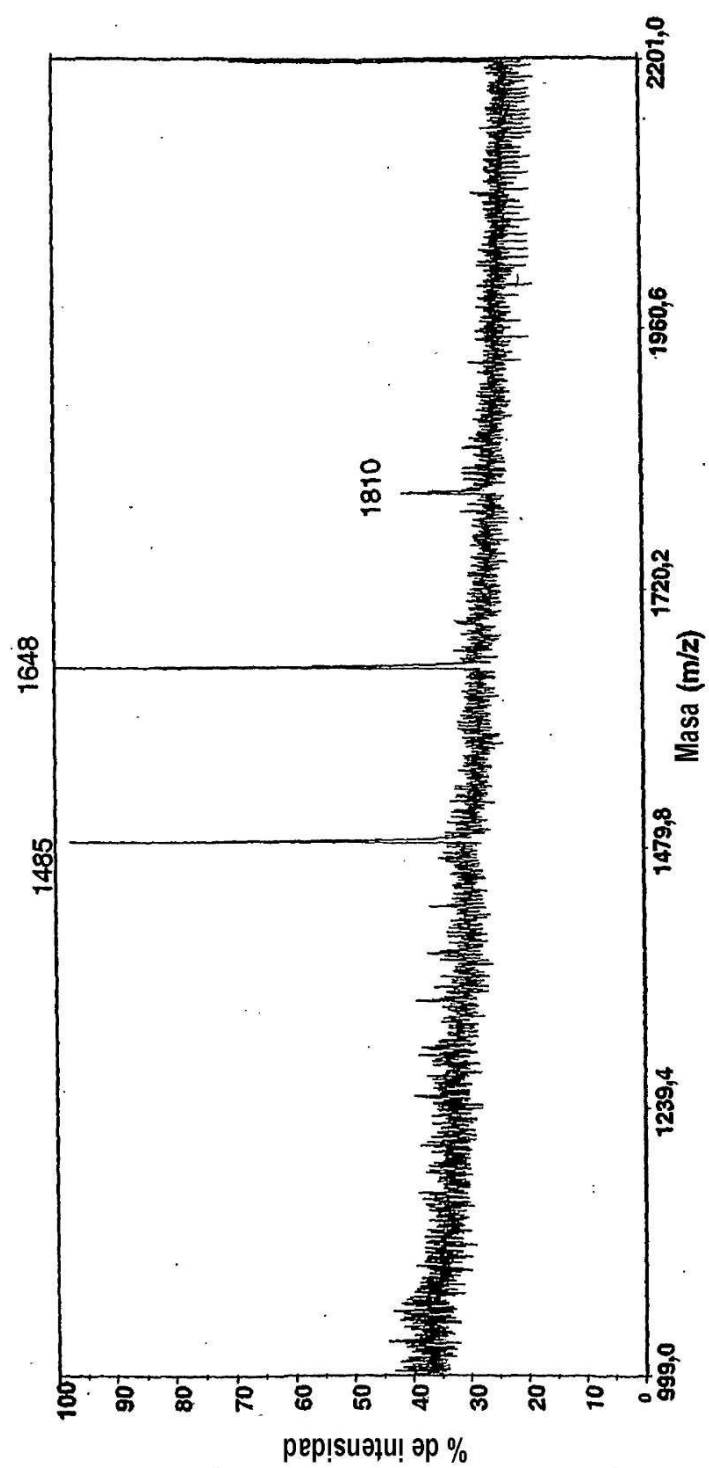


Figura 6

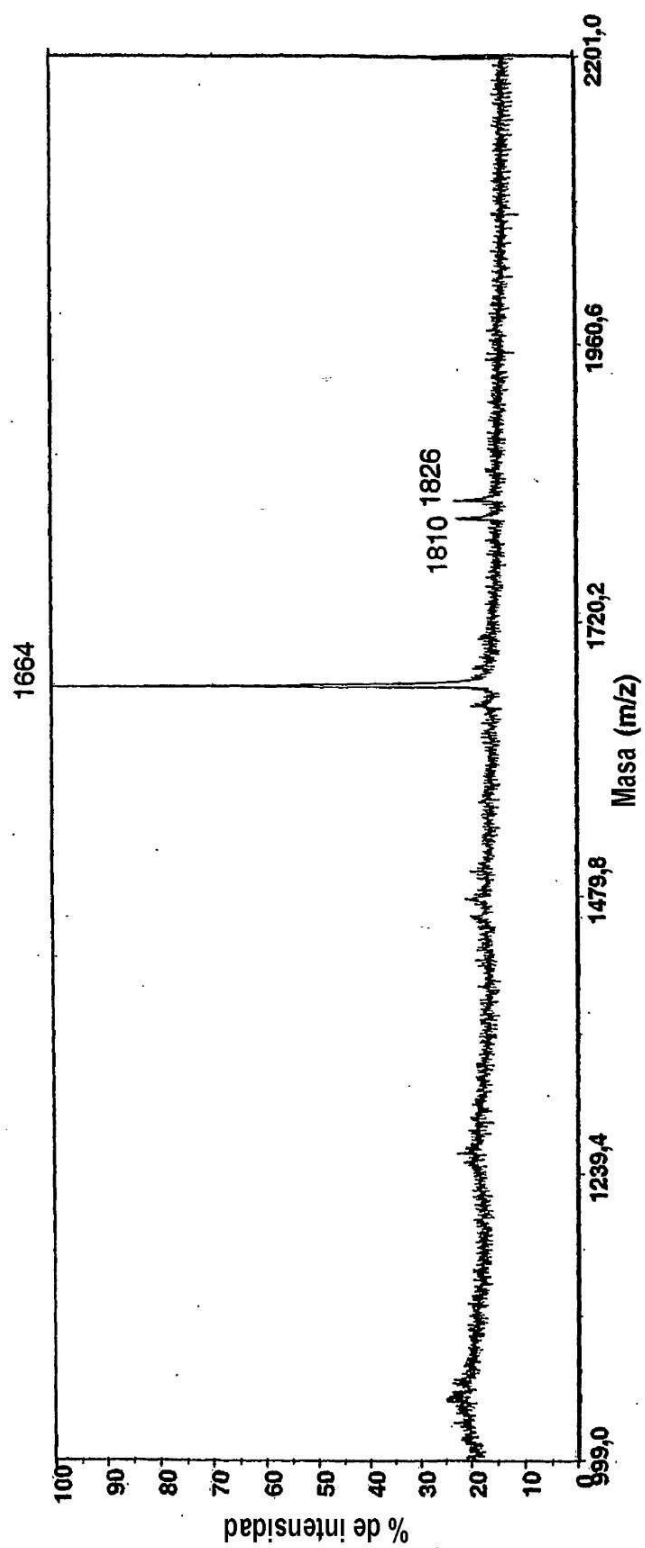


Figura 7

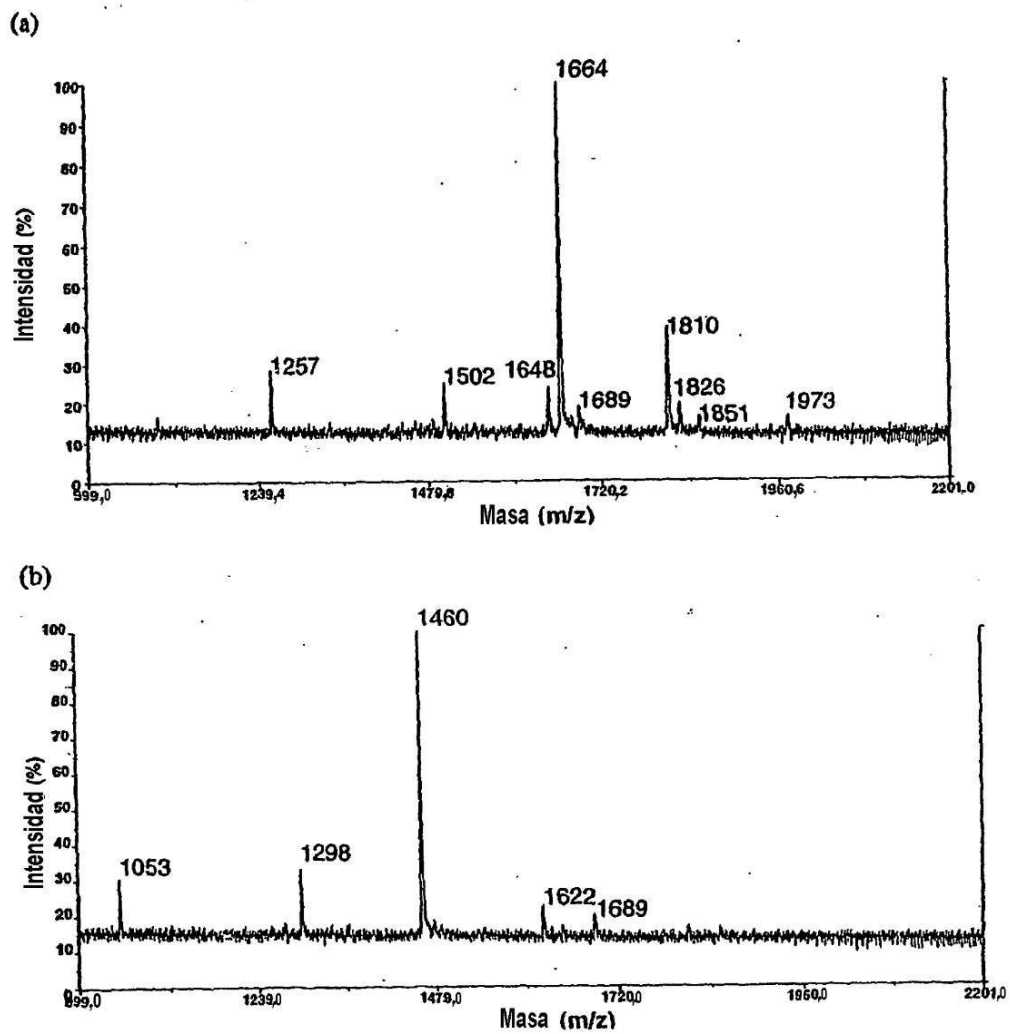
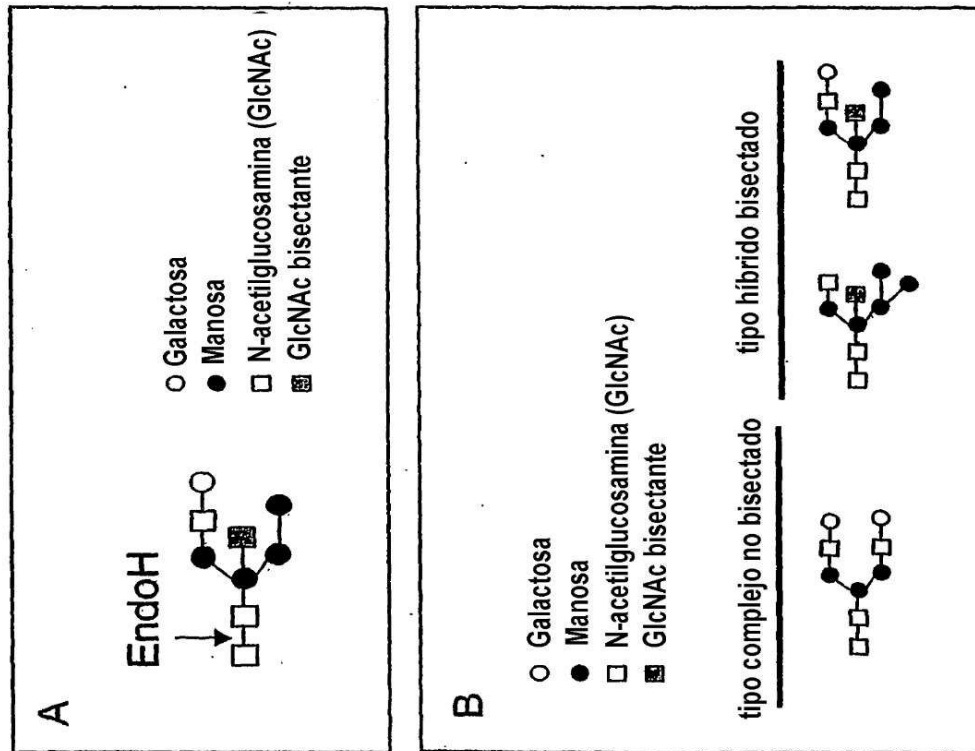


Figura 8



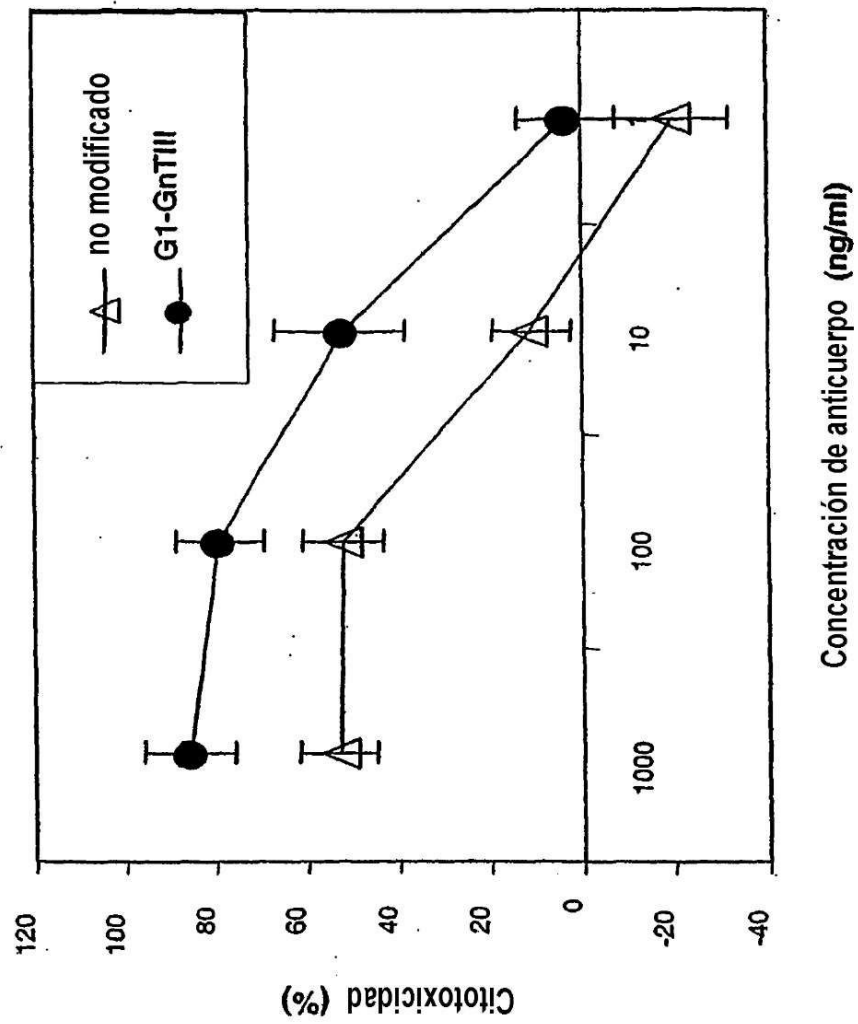
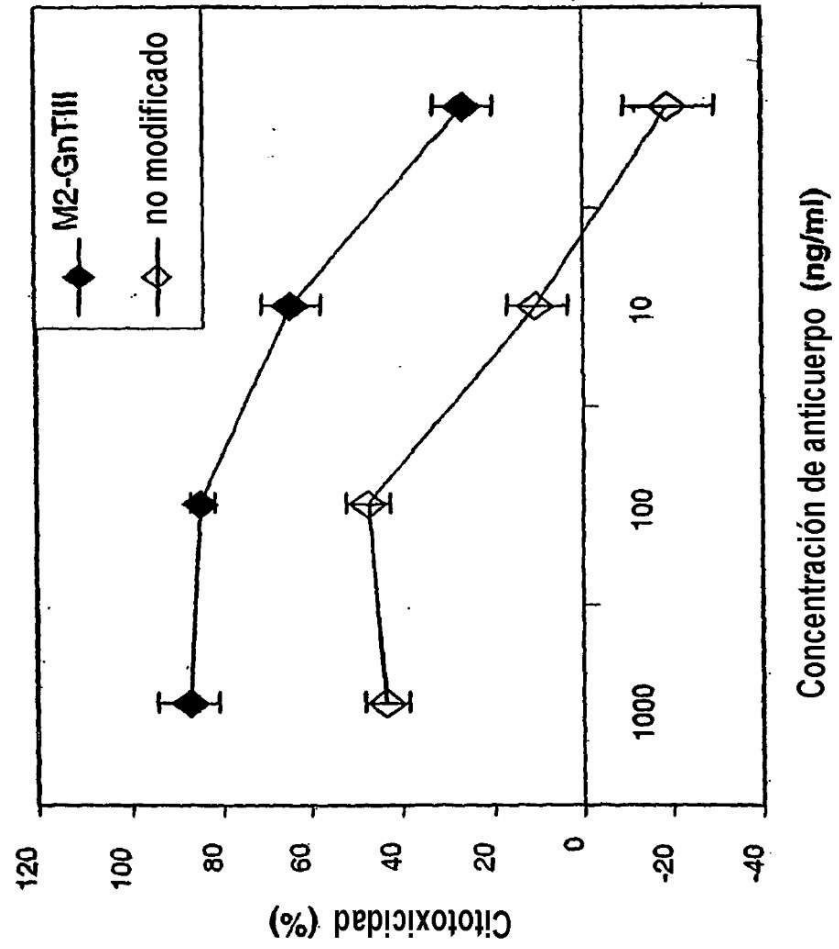


Figura 9

Figura 10



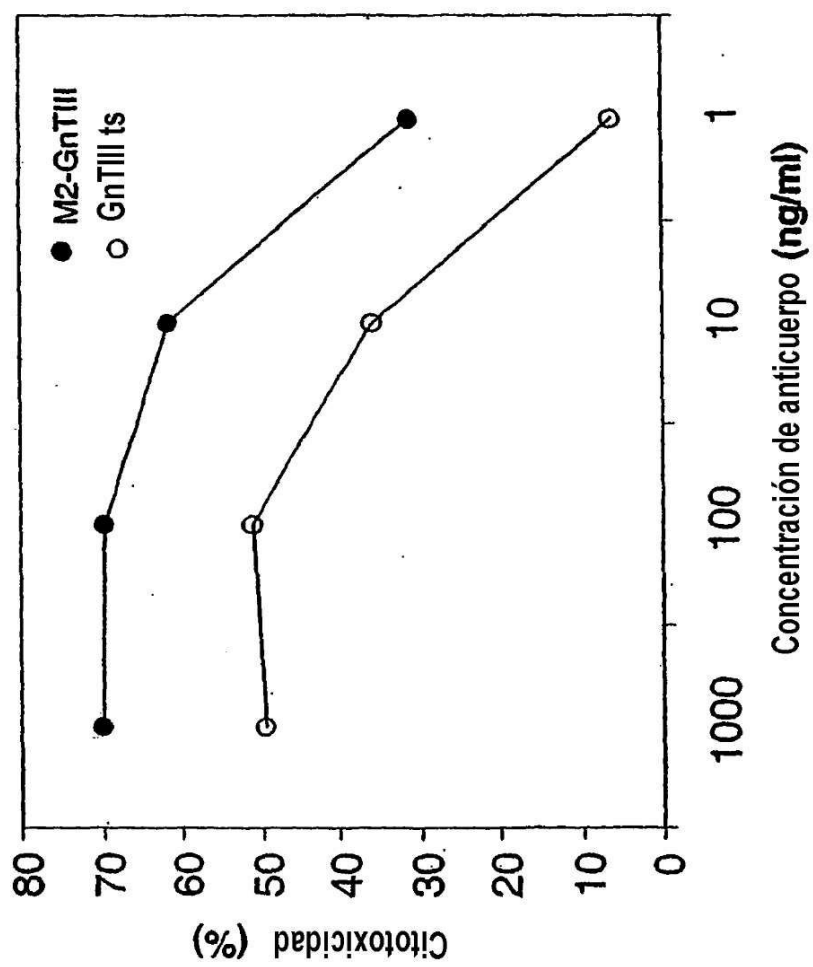


Figura 11



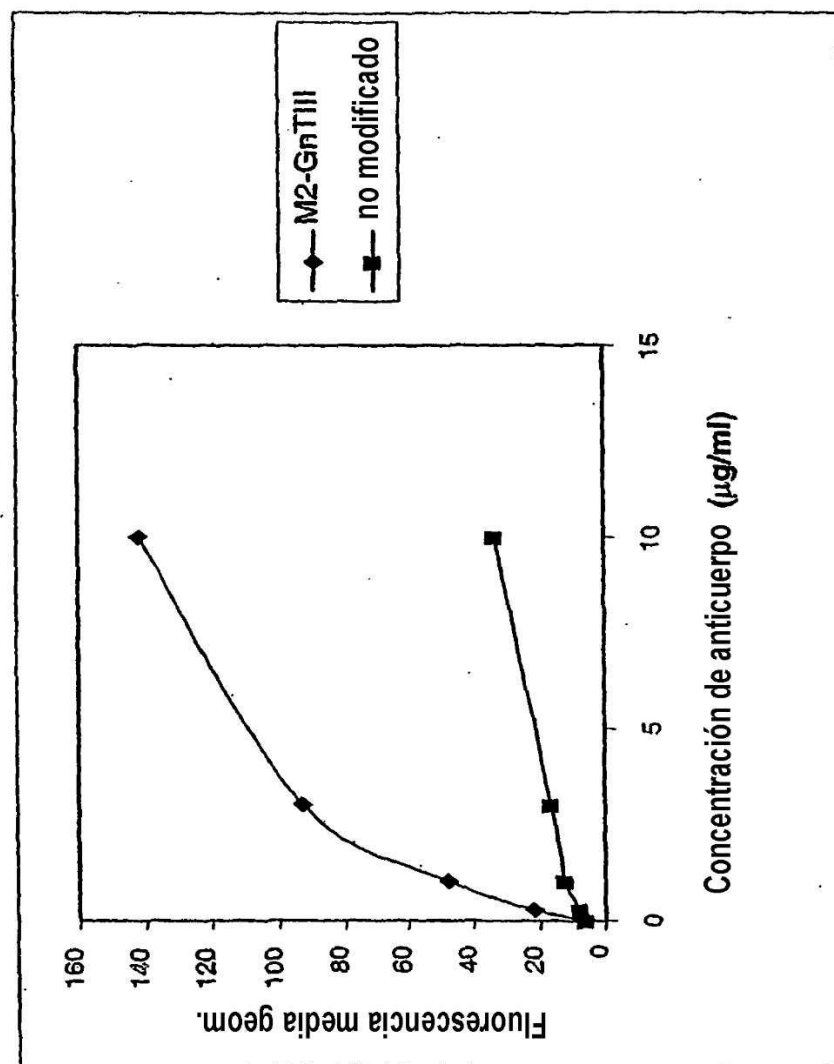


Figura 12

Figura 13

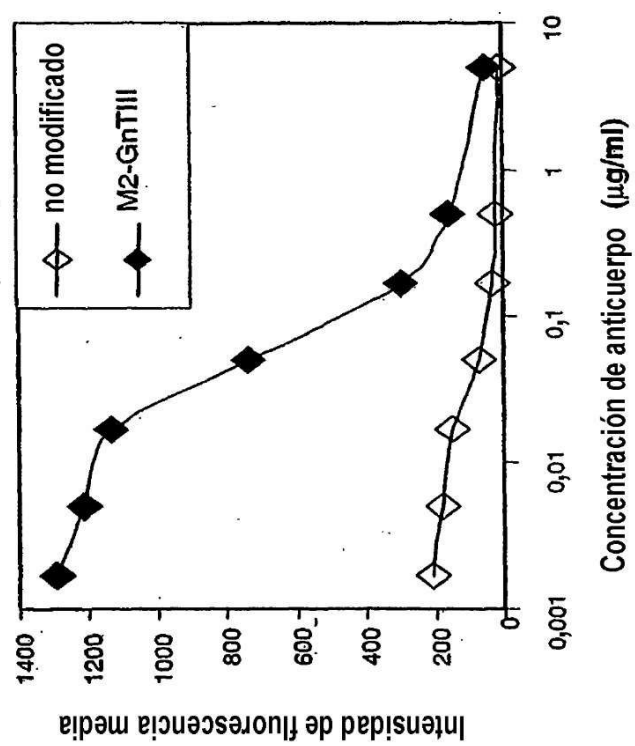


Figura 14

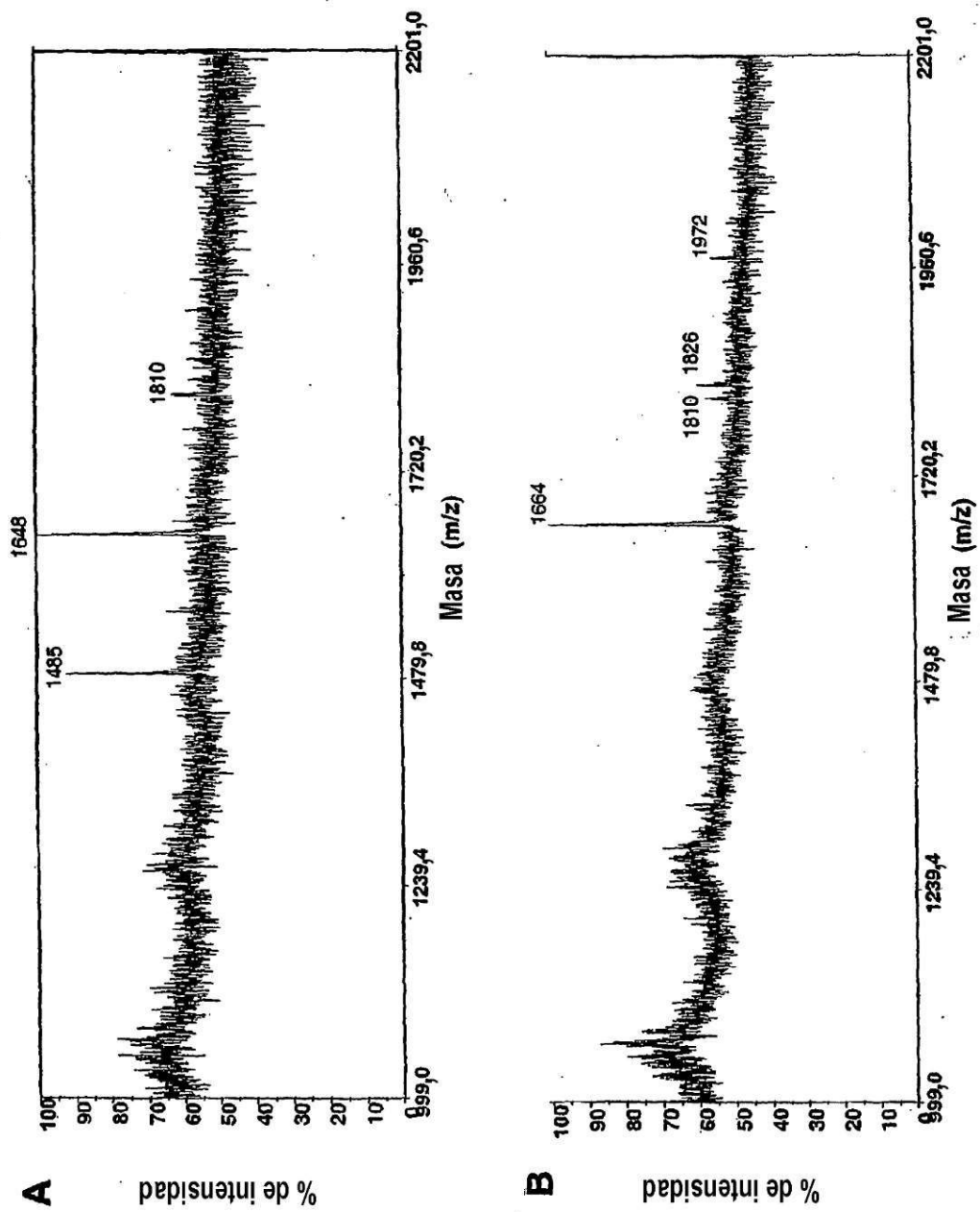


Figura 15

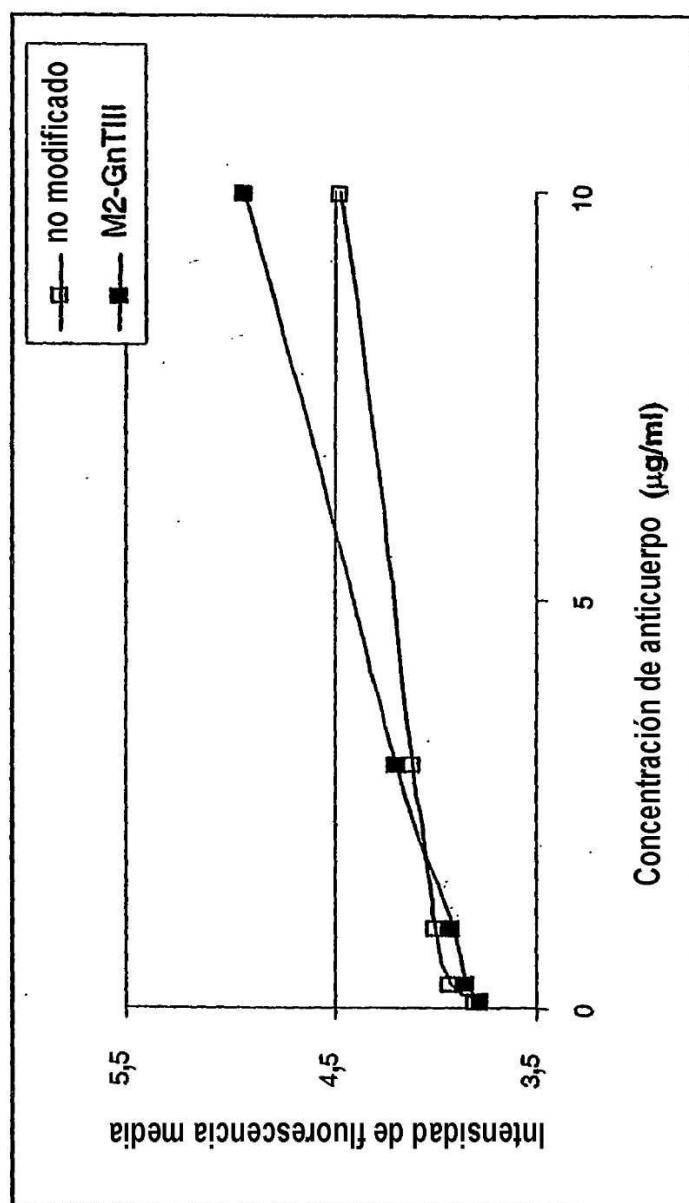


Figura 16

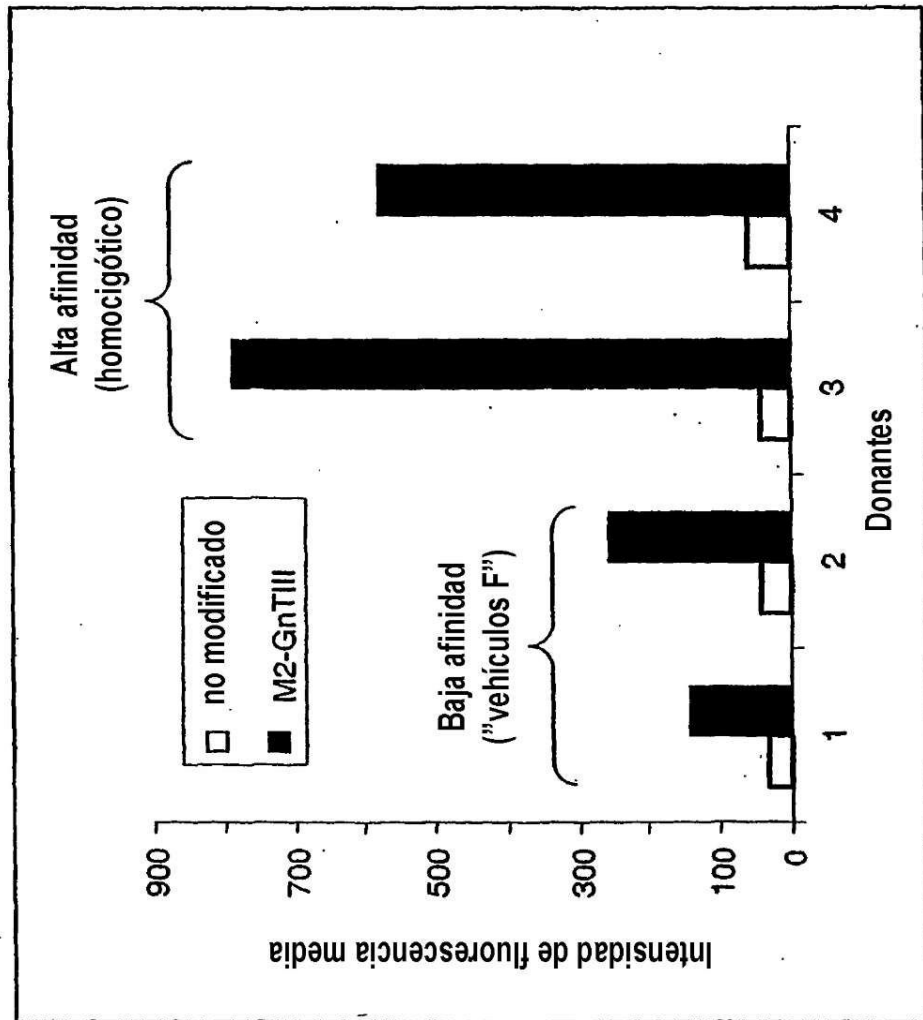


Figura 17

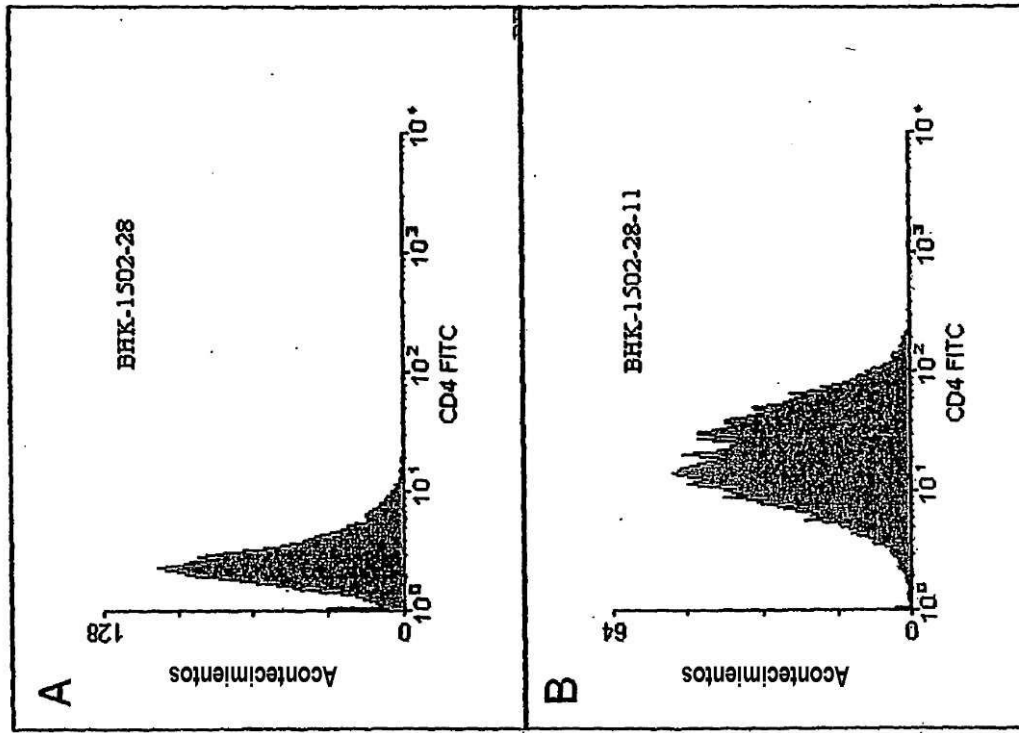


Figura 18

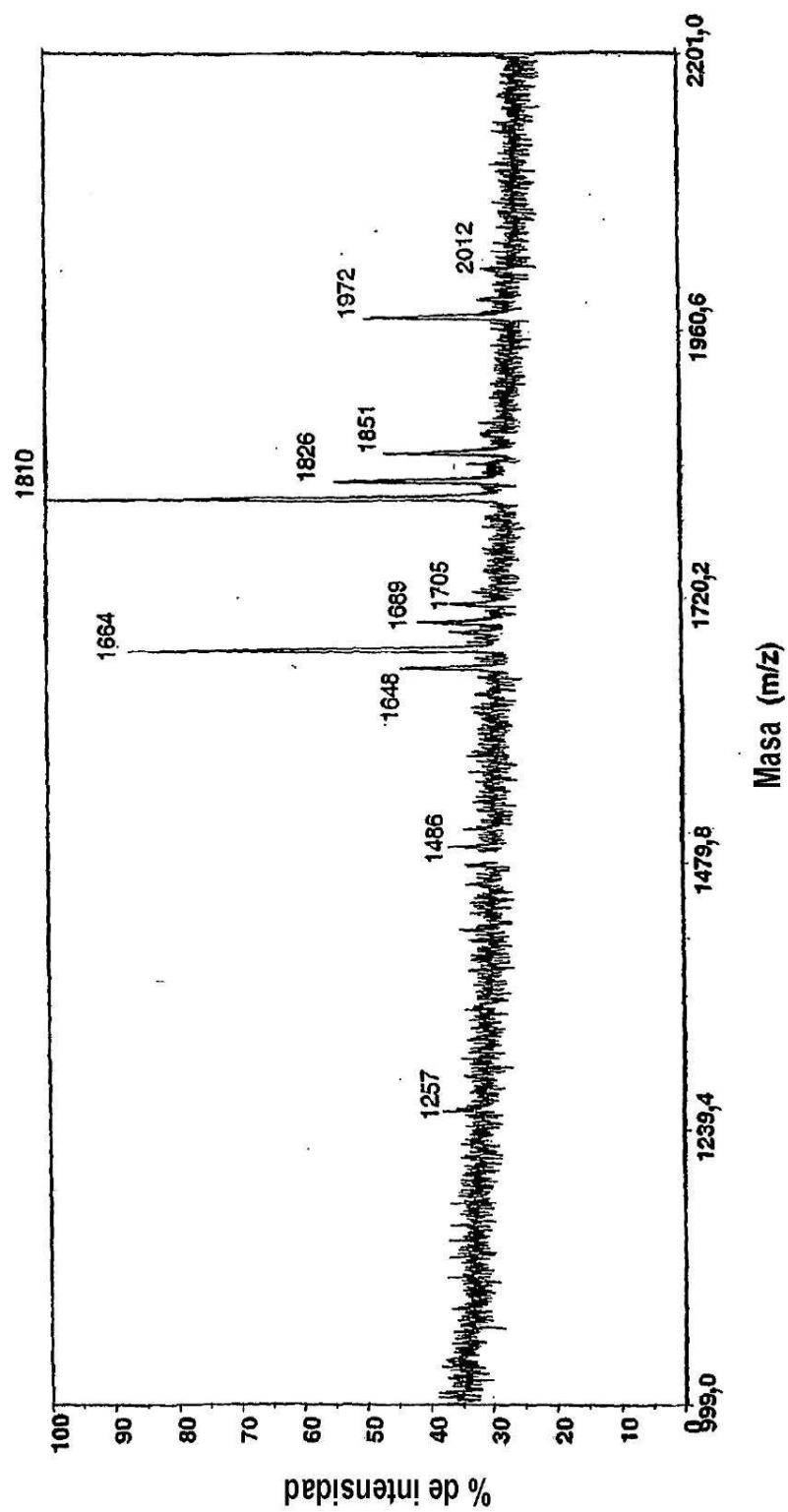


Figura 19

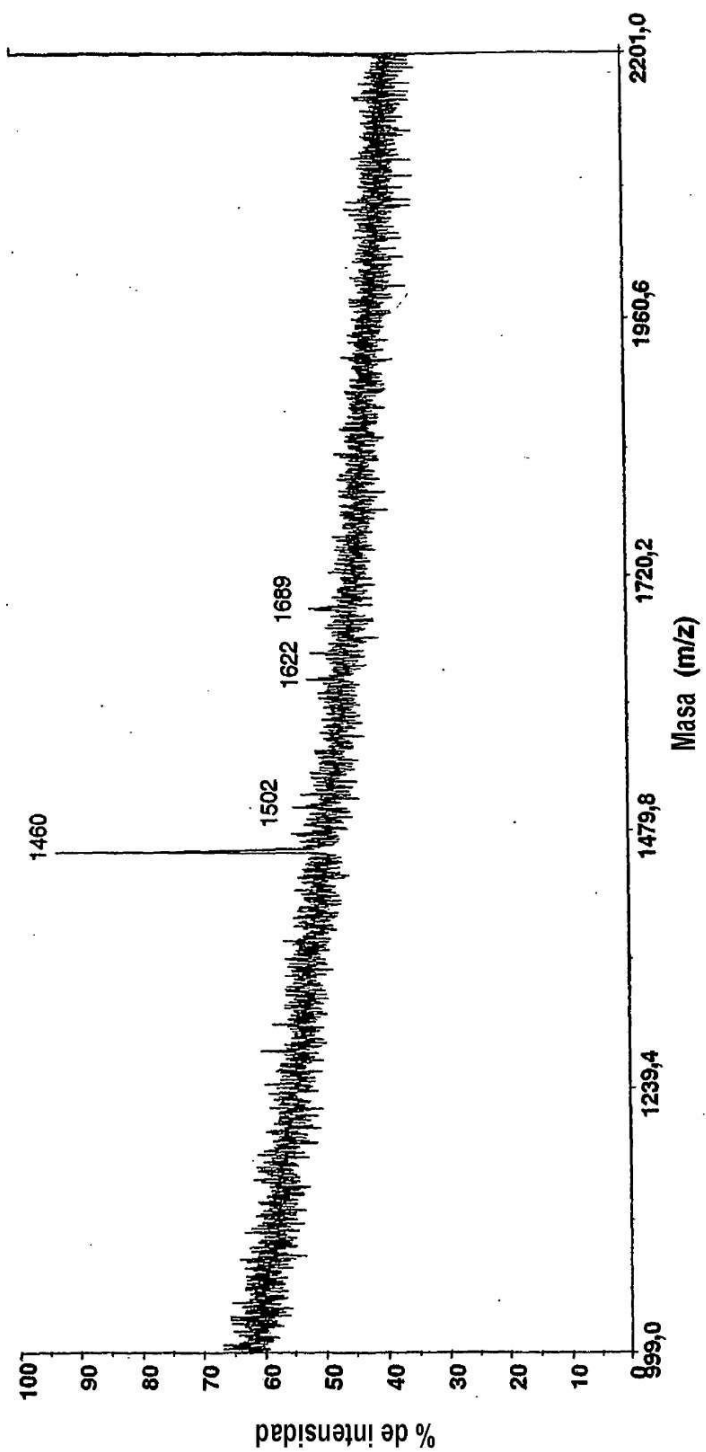




Figura 20

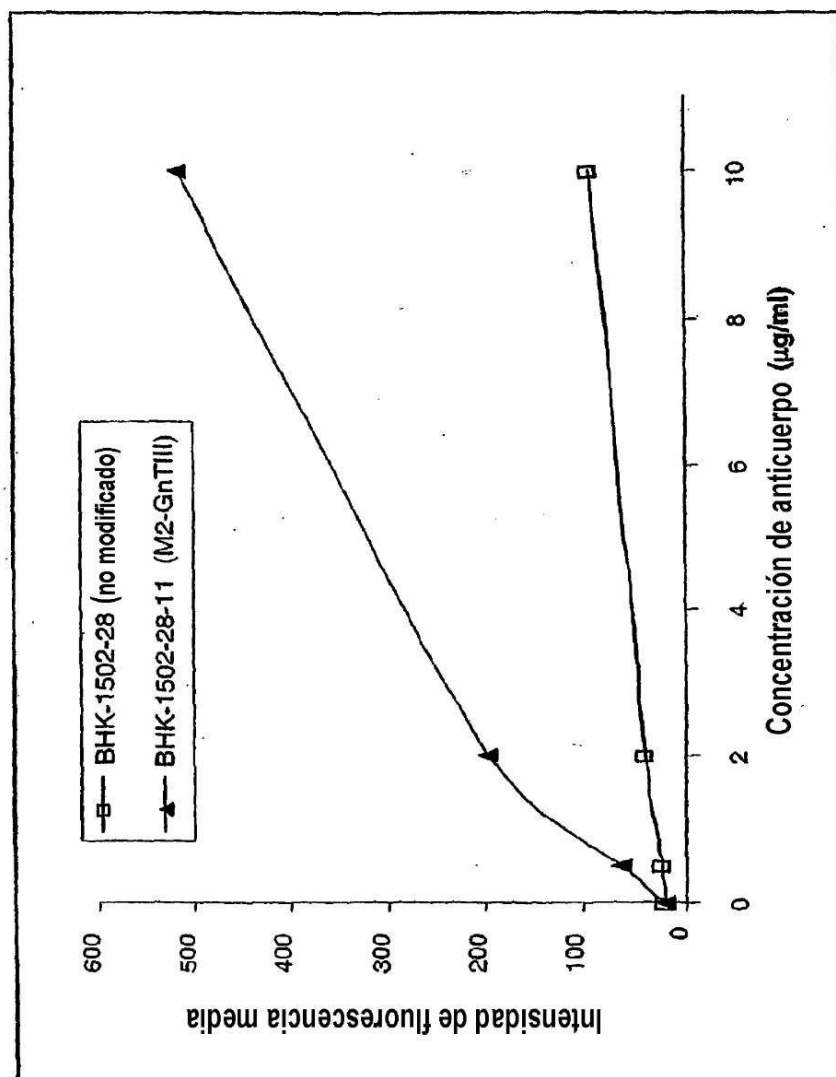


Figura 21

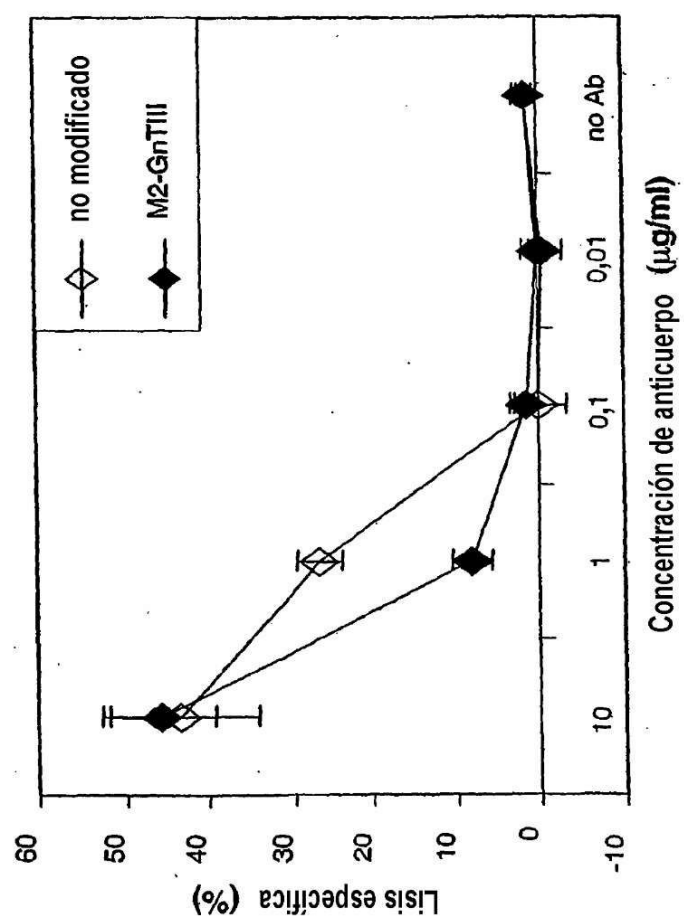


Figura 22

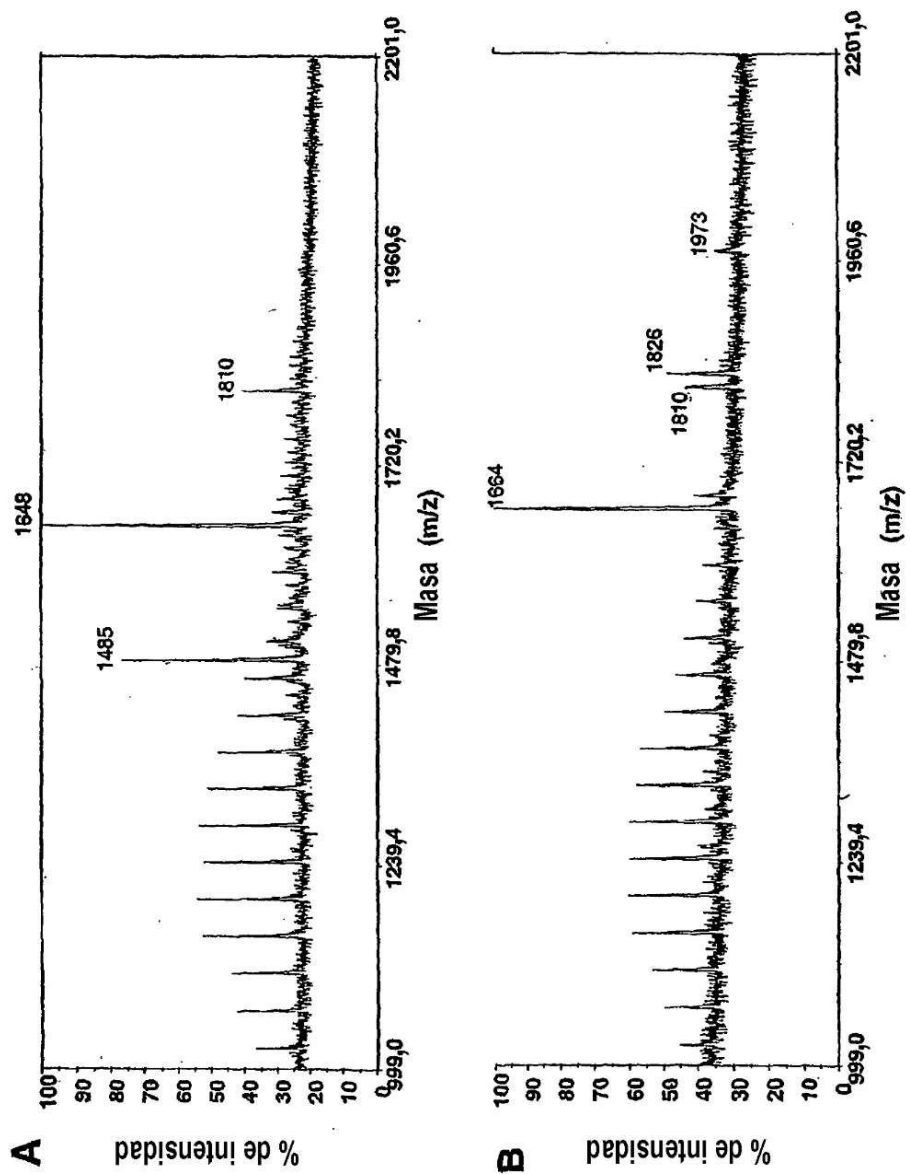
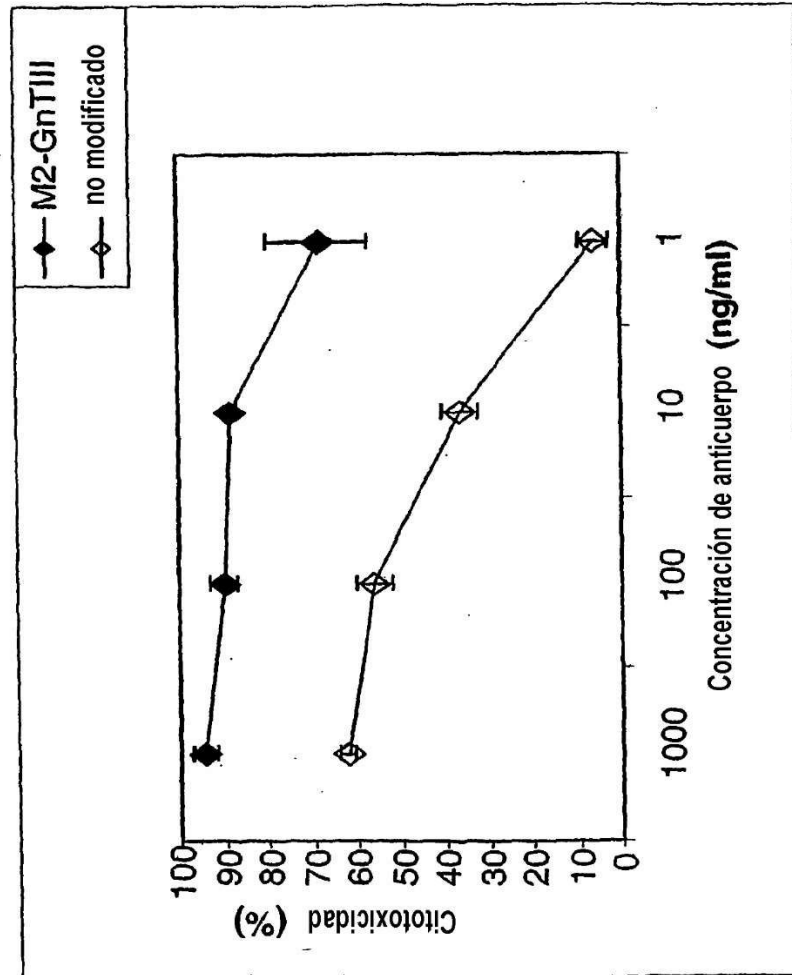


Figura 23



**ManII-GnTIII:**

Negrita: dominio de localización de ManII (cola citoplásmica + región transmembrana + región troncal)

ATGAAGTTAAGCCGCCAGTTCACCGTGTTCGGCAGTGCATCTTCTGTGTGGTGATTTTC  
TCGCTCTACCTGATGCTGGACCGGGGTCACTTAGACTACCCAGGAACCCGCGCCGAG  
GGCTCCTTCCCTCAGGGCCAGCTCTCAATGTTGCAAGAAAAATAGACCATTGAGCGT  
TTGCTAGCTGAGAATAATGAGATCATCTCAAATATTAGAGACTCAGTCATCAATTTGAGT  
GAGTCTGTGGAGGATGGTCCGAAAAGTTTCAAAAGCAATTTAGCCAAAGGTGCTGGCTCA  
CCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCCTAGCAAGGCCACCGAAGAACTGCACCGGGTGGACTTC  
GTGTTGCCGGAGGACACCACAGAGTATTTTGTGCGCACCAAGCTGGCGGTGTGTGCTTC  
AAACCAGGTACCAGGATGCTGGAGAAACCTTCTCCAGGGCGGACAGAGGAGAAGACCAAG  
GTGGCTGAGGGGTCTTCGGTCCGGGGTCTGCTCGGAGGCCATGCGGCATGTGTTGAGT  
GCACGGGAGCGCCTGGGAGGCCGGGGCACTAGGCGCAAGTGGGTTGAGTGTGTGTGCTG  
CCAGGCTGGCACGGGCCAGCTGCGGGGTGCCACTGTGGTCCAGTATTCCAACCTGCCC  
ACCAAGGAGCGCCTGGTACCCAGGGAGGTGCCGAGGCGGGTTATCAACGCCATCAACATC  
AACCATGAGTTTCGACCTGCTGGATGTGCGCTTCCATGAGCTGGGCGATGTTGTGGACGCC  
TTTGTGGTCTGCGAATCCAATTTACCGCCTACGGGGAGCCTCGGCCGCTCAAGTTCCGA  
GAGATGCTGACCAATGGCACCTTCGAGTACATCCGCCACAAGGTGCTCTACGTCTTCTG  
GACCACTTCCCACCTGGTGGCCGTGAGGACGGCTGGATTGCAGACGACTACCTGCGTACC  
TTCTTCACCCAGGATGGTGTCTCCCGCCTGCGCAACCTGCGACCTGATGACGTCTTTATC  
ATCGACGACGCGGACGAGATCCCTGCGCGTGATGGTGTGCTGTCTCAAGCTCTACGAT  
GGCTGGACAGAGCCCTTCGCCCTTCCATATGCGCAAGTCCCTGTATGGTCTTCTTTTGAAG  
CAACCAGGCACACTGGAGGTGGTGTGAGGCTGCACCATGACATGCTGCAGGCTGTGTAT  
GGGCTGGACGGCATCCGCCCTGCGCCGCCGTGAGTACTACCATGCCCCAATTTTCGACAG  
TATGAGAACCGCACCGGCCACATCCTAGTGACAGTGGTCTCTCGGCAGCCCCCTGCACCTC  
GCGGGCTGGCACTGCTCCTGGTGCTTACACCCGAGGGCATCTACTTCAAACCTCGTGTGCG  
GCCCAGAATGGTGACTTCCCCCGCTGGGGTGACTACGAGGACAAGAGGGACCTCAATTAC  
ATCCGAAGCTTGATTGCACTGGGGGATGGTTCGACGGCACGACGAGGAGTACCTCCT  
GCAGACCCCTGATGAACACATGTATGCTCCTAAGTACCTGCTCAAGAACTATGACCACTC  
CGTACTTGTCTCGAAAATCCCTACCGGGAGCCCAAGAGCACTGTAGAGGGTGGGCGCCGG  
AACCAGGGCTCAGACGGAAGGTATCTGCTGTGAGGGGCAAGTTGGATACAACGGAGGGC  
CCGGAACAGAACTGATCTCTGAAGAGGACCTGTAG

MKLSRQFTVFGSAIFCVVIFSLYLMLDRGHLDPNPNRREGSFPQGQLSMLQEKIDHLER  
LLAENNEIISNIRDSVINLSESVEDGPKSSQSNFSQAGSPLLQPLSPSKATEELHRVDF  
VLPEDTTEYFVRTKAGGVCFKPGTRMLEKPSPGRTEERTKVAEGSSVRGPARRPMPRHVLS  
ARERLGGRTTRKWWECVCLPGWHGPSCGVPTVVQYSNLPTKERLVPREVPRRVINAINI  
NHEFDLLDVRFHLDGVVDAFVVCESNFTAYGEPRPLKFREMLTNGTFEYIRHKVLYVFL  
DHFPPGGRQDGIADDDYLRFTLTQDGVSRRLNLRPDDVFIIDDADEIPARDGVLFLKLYD  
GWTEPFAFHMRSLSLYGFFWKQPGTLEVVSCTIDMLQAVYGLDGIRLRRRQYYTTPNFQ  
YENRTGHILVQWSLGSPLHFAGWHCSWCFTPEGIYFKLVSAQNGDFPRWGDYEDKRDLY  
IRSLIRTGGWFDGTQQEYPPADPSEHMYAPKYLLKNYDQFRYLLNYPYREPKSTVEGGRR  
NQGSDGRSSAVRGKLDTEGPEQKLISEEDL

Figura 24

**GnTI-GnTIII**

**Negrita:** dominio de localización de ManII GnTI (cola citoplásmica + región transmembrana + región troncal)

ATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGCTTGTGCTGTGGGGCGCTATCCTCTTTGTGGCCTGG  
 AATGCCCTGCTGCTCCTCTTCTTCTGACGCGCCAGCACCTGGCAGGCCACCCCTCAGTC  
 AGCGCTCTCGATGGCGACCCCGCCAGCCTCACCCGGGAAGTGATTGCGCTGGCCCCAAGAC  
 GCCGAGTGGAGCTGGAGCGGCAGCCTGGGCTGCTGCAGCAGATCGGGGATGCCCTGTGCG  
 AGCCAGCGGGGGAGGGTGGCCACCGCGGCCCTCCCGCCAGCCGCGTGTGCTGTGACC  
 CCGCGCCCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCCTAGCAAGGCCACCGAAGAACTGCACCGGGTG  
 GACTTCGTGTGCGGAGGACACCACAGAGTATTTTGTGCGCACCAAAGCTGGCGGTGTG  
 TGCTTCAAACCAGGTACCAGGATGCTGGAGAAACCTTCTCCAGGGCGGACAGAGGAGAAG  
 ACCAAGGTGGCTGAGGGGTCTCGGTCCGGGTCTTGTCTCGAGGCCATGCGGCATGTG  
 TTGAGTGCACGGGAGCGCTGGGAGGCCGGGGCAC'TAGGCGCAAGTGGGTGAGTGTGTG  
 TGCCTGCCAGGCTGGCACGGGCCAGCTGCGGGGTGCCACTGTGGTCCAGTATTCCAAC  
 CTGCCCCACCAAGGAGCGCTGGTACCCAGGGAGGTGCCGAGGCGGGTTATCAACGCCATC  
 AACATCAACCATGAGTTCGACCTGCTGGATGTGCGCTTCCATGAGCTGGGCGATGTTGTG  
 GACGCGCTTTGTGGTCTGCGAATCCAATTTACCGCCTACGGGGAGCCTCGGCCGCTCAAG  
 TTCCGAGAGATGCTGACCAATGGCACCTTCGAGTACATCCGCCACAAGGTGCTCTACGTC  
 TTCCTGGACCCTTCCCACCTGGTGGCGCTCAGGACGGCTGGATTGCAGACGACTACCTG  
 CGTACCTTCTCACCCAGGATGGTGTCTCCCGCTGCGCAACCTGCGACCTGATGACGTC  
 TTTATCATCGACGACGCGGACGAGATCCC'TGCGCGTGATGGTGTGCTGTTCTCAAGCTC  
 TACGATGGCTGGACAGAGCCCTTCGCCCTTCCATATGCGCAAGTCCCTGTATGGTTTCTTT  
 TGAAGCAACCAGGCACACTGGAGGTGGTGTGAGGCTGCACCATTGACATGCTGCAGGCT  
 GTGTATGGGCTGGACGGCATCCGCC'TGCGCCGCCGTCAGTACTACACCATGCCCACTTT  
 CGACAGTATGAGAACCGCACCGGCCACATCCTAGTGCAGTGGTCTCTCGGCAGCCCCCTG  
 CACTTCGCGGGCTGGCACTGCTCCTGGTGTCTCACACCGAGGGCATCTACTTCAAACCTC  
 GTGTGCGGCCAGAAATGGTGACTTCCCCCGCTGGGGTGACTACGAGGACAAGAGGGACCTC  
 AATTACATCCGAAGCTTGATTCGCAC'TGGGGGATGGTTCGACGGCACGCAGCAGGAGTAC  
 CCTCTGCAGACCCAGTGAACACATGTATGCTCCTAAGTACCTGCTCAAGAACTATGAC  
 CAGTTCCGCTACTTGCTCGAAAATCCCTACCGGGAGCCCAAGAGCACTGTAGAGGGTGGG  
 CGCCGGAACCAGGGCTCAGACGGAAGGTCATCTGCTGTGAGGGCAAGTTGGATACAACG  
 GAGGGCCCCGAACAGAACTGATCTCTGAAGAGGACCTGTAG

MLFKQSAGIWLWGAILFVAWNALLLLFFWTRPAPGRPPSVSALDGDPA~~SL~~TREVIRLAQD  
 AEVELERQ~~R~~GLLQ~~I~~GDALSSQ~~R~~GRVPTAAPP~~A~~QPRVPVTPAPLLQPLSPSKATEELHRV  
 DFVLPEDTTEYFVRTKAGGVCFKPGTRMLEKPSGRTEETKVAEGSSVRGPARRP~~M~~HRV  
 LSARERLGGRTRRKWVECVCLPGWHGPPSCGVPTVVQYSNLP~~T~~KERLVPREVP~~R~~RVINAI  
 NINHEFDLLDVRFH~~E~~LGDVVD~~A~~FVVCESNFTAYGEPRPLKFR~~E~~MLTNGTFEYIRHKVLYV  
 FLDHFP~~P~~GG~~R~~QD~~G~~WIAD~~D~~YLRTFLTQDGVSR~~L~~RNL~~R~~PDDVFIIDDAEI~~P~~ARDGV~~L~~FLKL  
 YDGWTEPFAF~~H~~MRKSLY~~G~~FFWKQPGTLEVVSGCTIDMLQAVYGLD~~G~~IRLRRRQYYT~~M~~PNF  
 RQYENRTGHILVQWSLGSPLH~~F~~AGWHCSWCFTPEGIYFKLVSAQNGDFPRWGDYEDK~~R~~DL  
 NYIRSLIRTGGWFDGTQ~~Q~~EYPPADPSEHMYAPKYL~~L~~KNYDQFRY~~L~~LENPYREP~~K~~STVEGG  
 RRNQSDGRSSAVRGKLD~~T~~TEGPEQKLI~~S~~EEDL

**Figura 25**

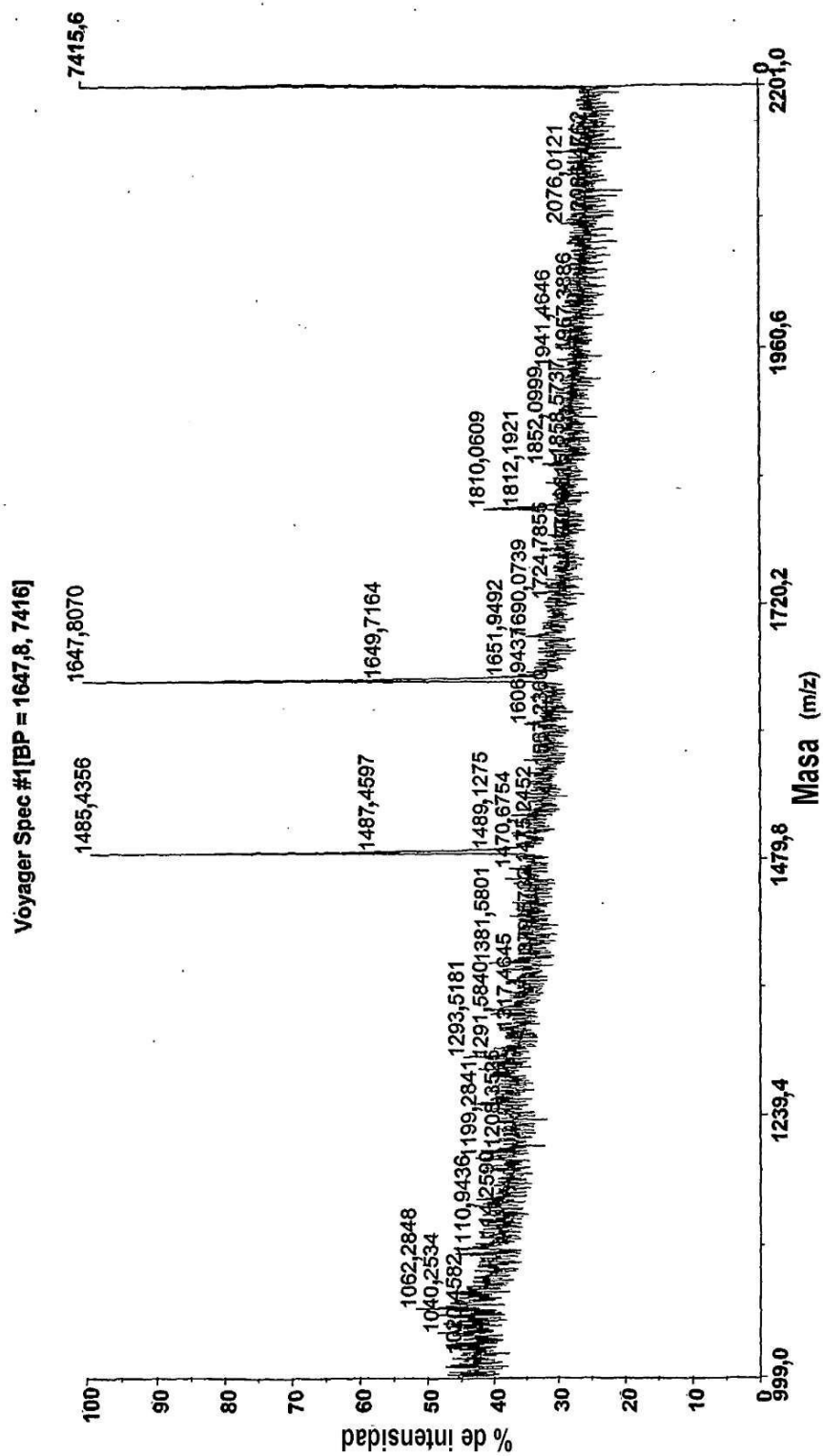


FIG. 26

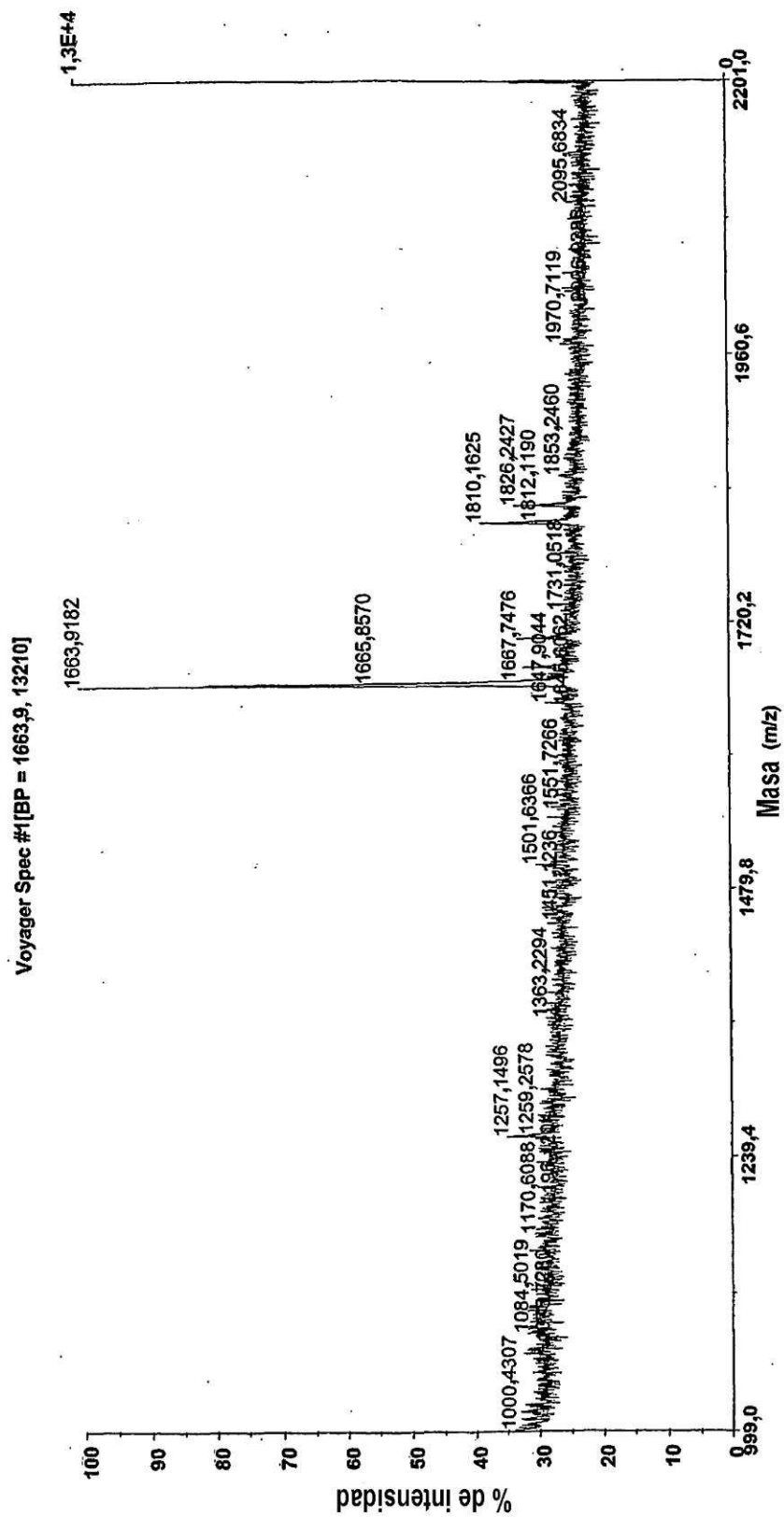


FIG. 27A



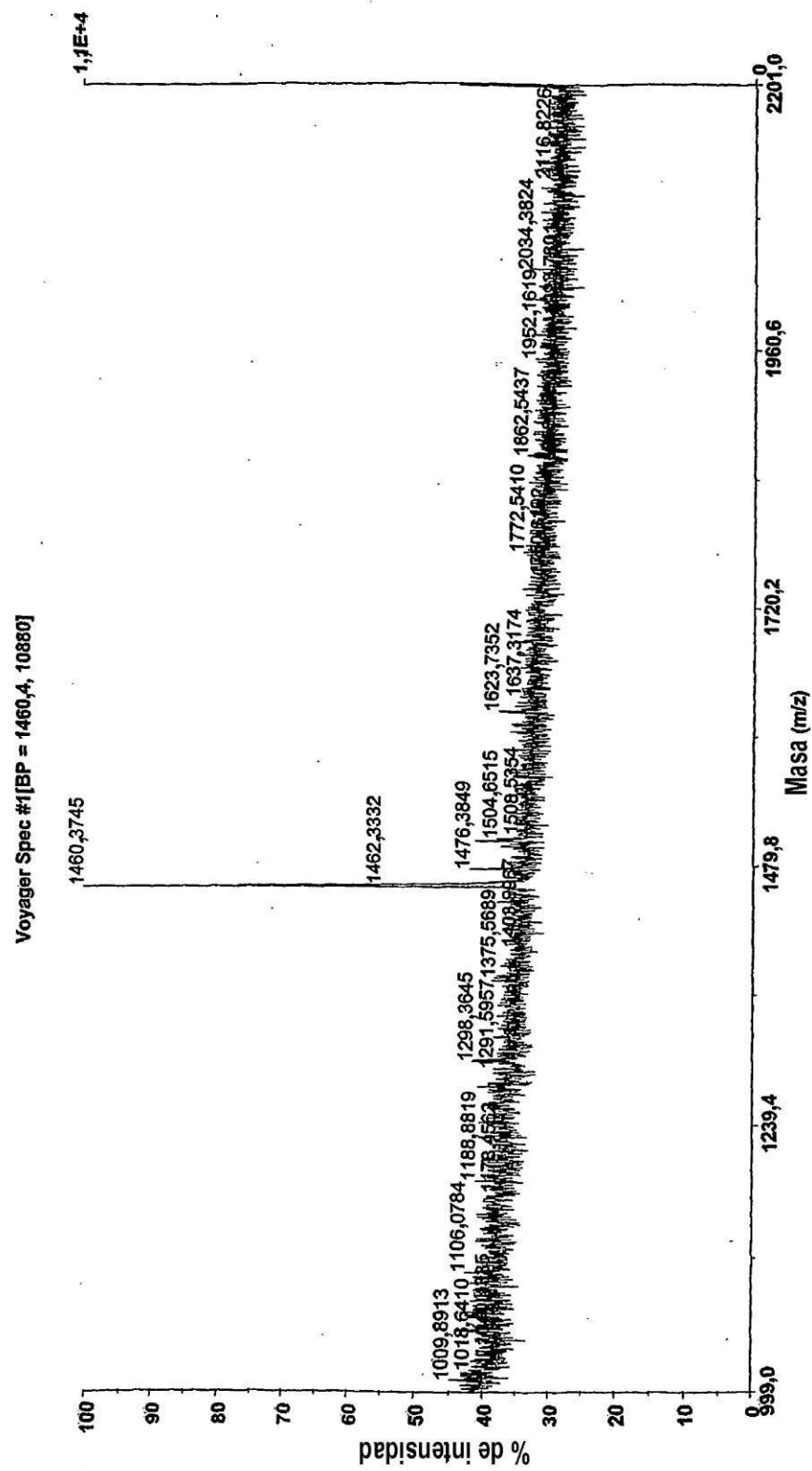
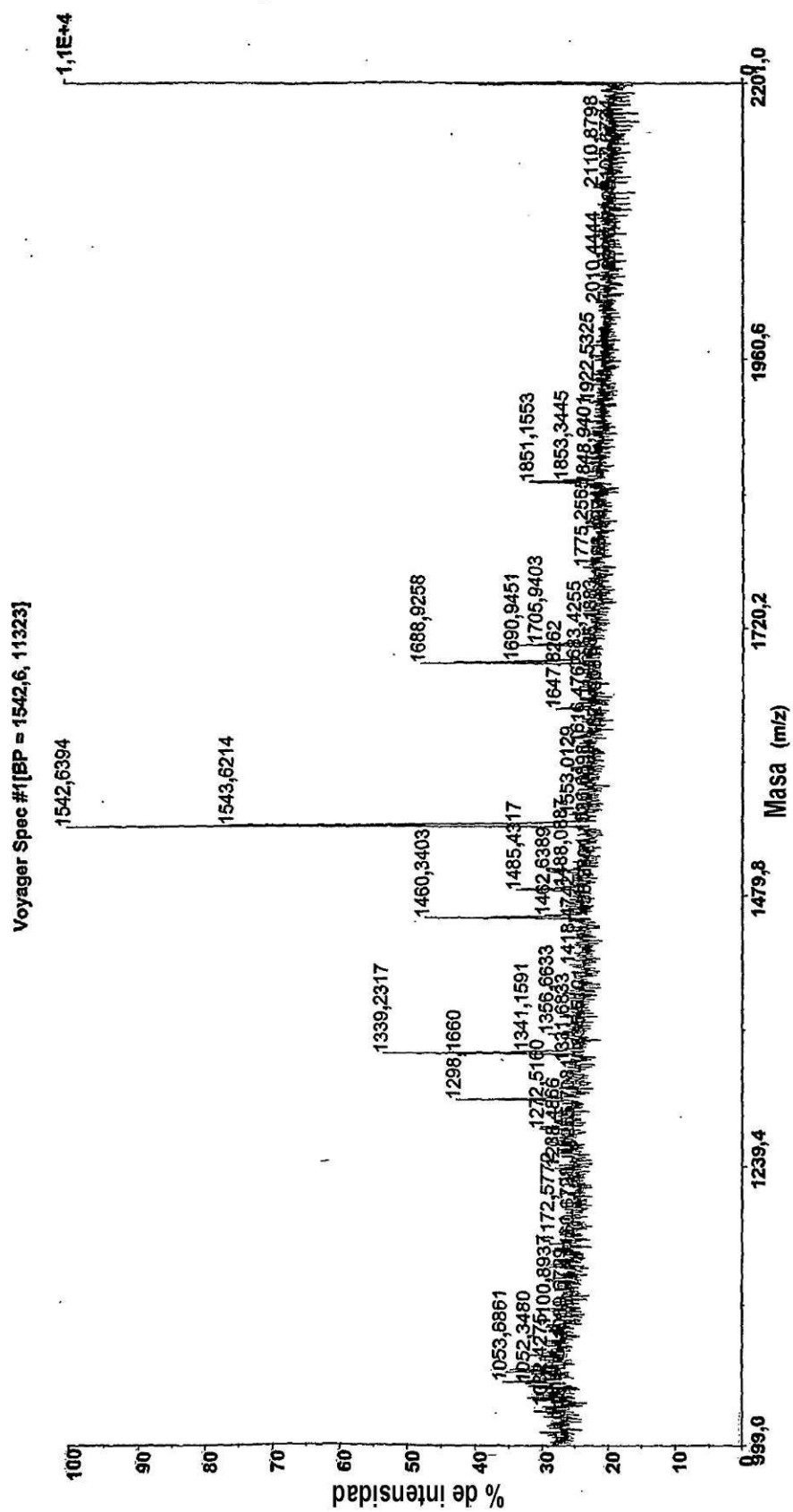


FIG. 27B





**FIG. 28B**

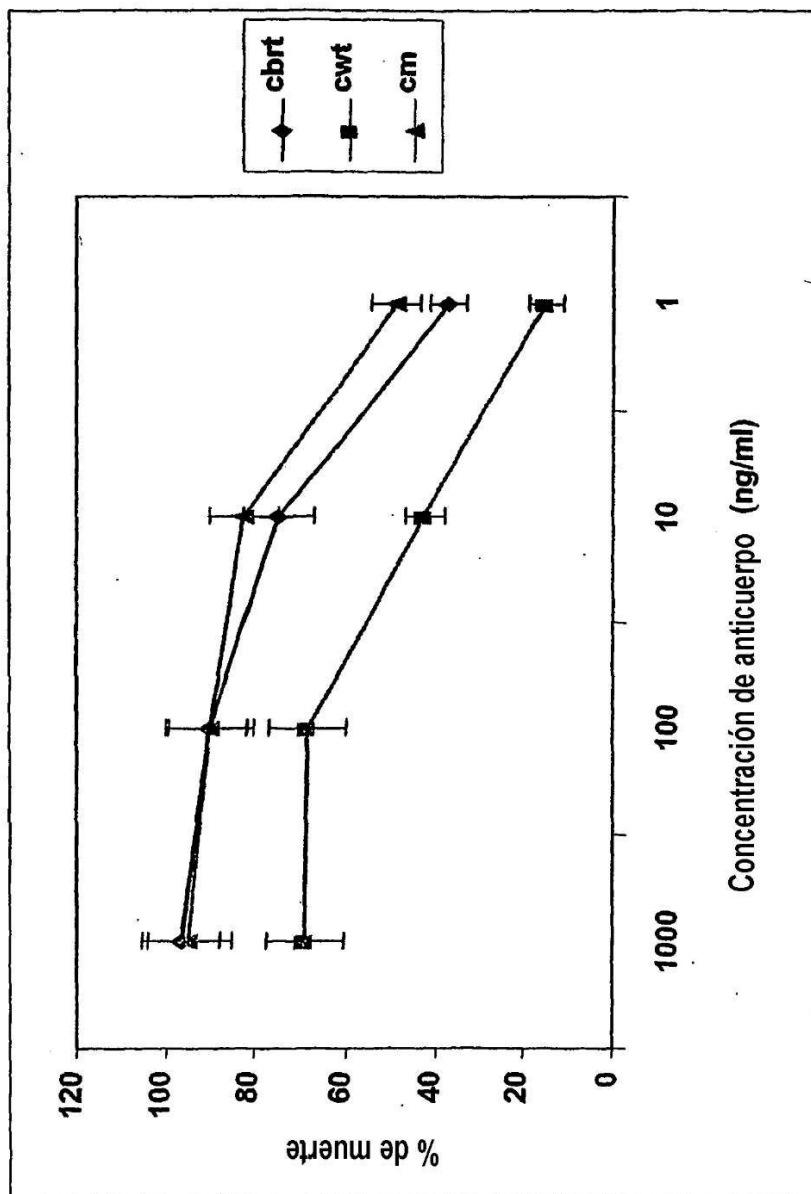


FIG. 29

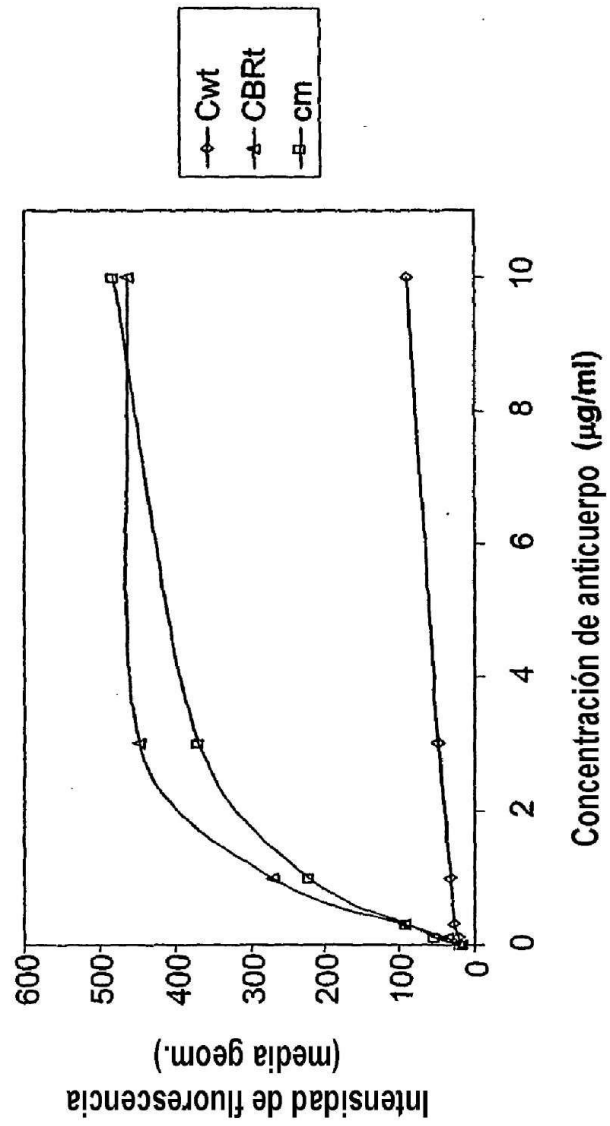


FIG. 30

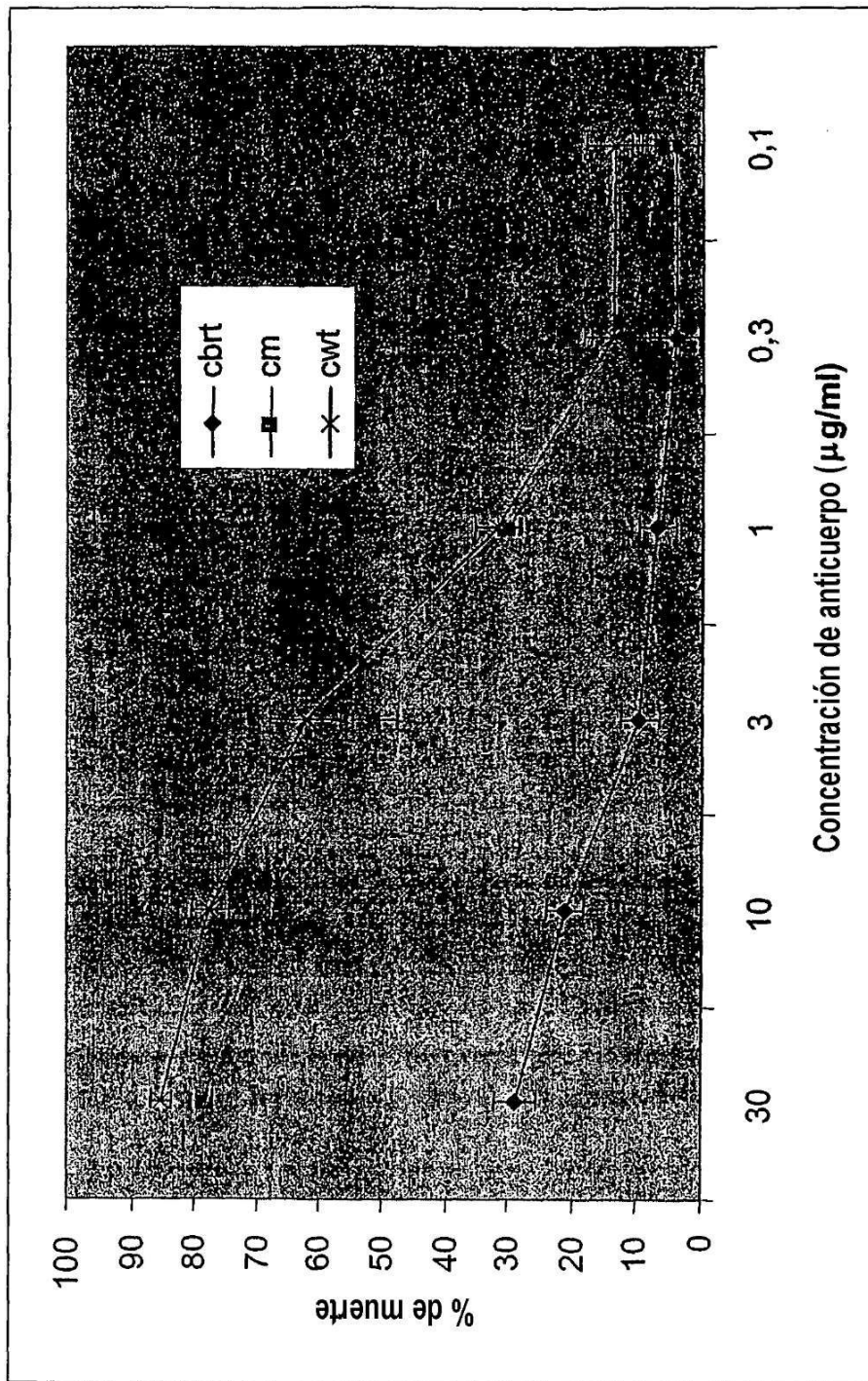


FIG. 31

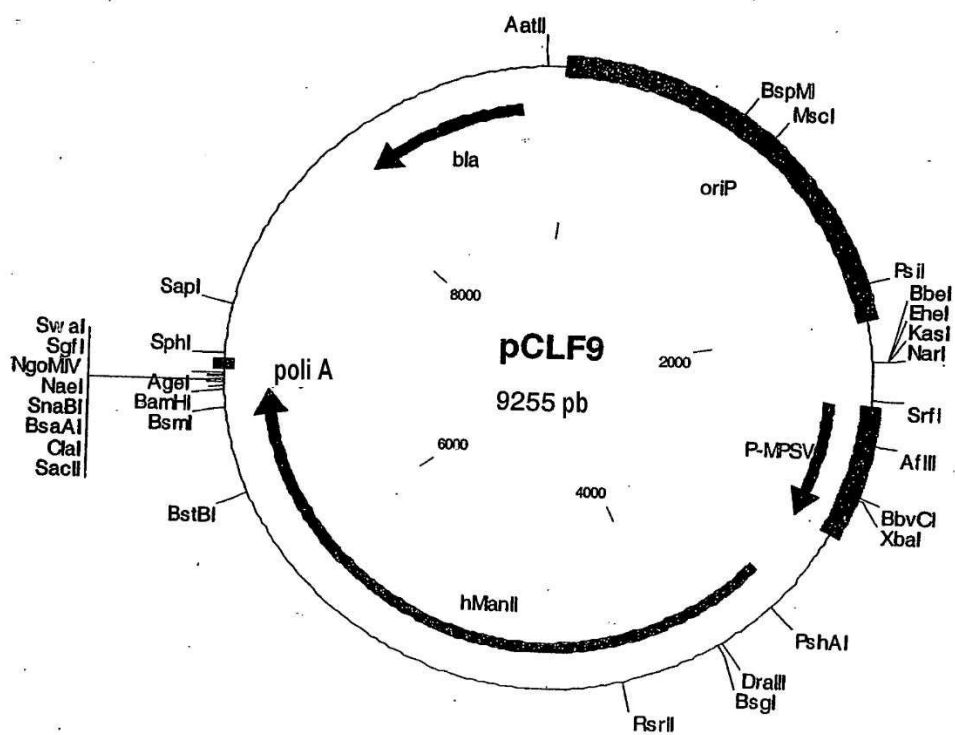


FIG. 32A

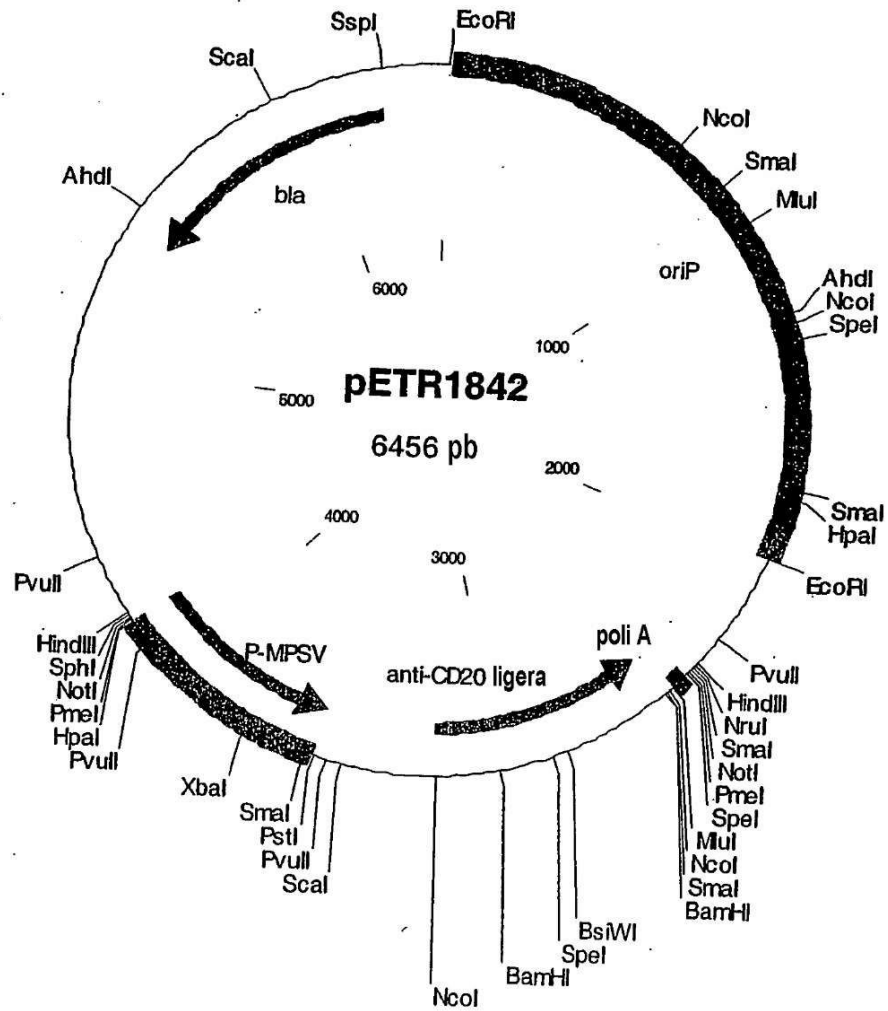


FIG. 32B



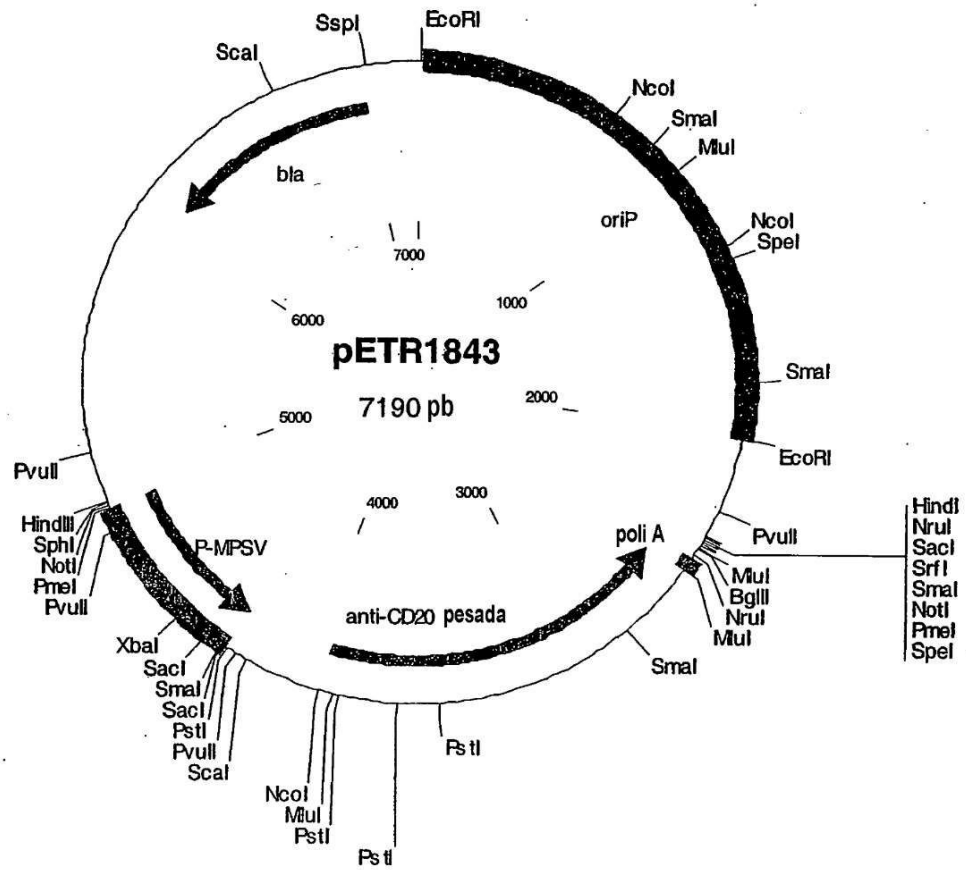


FIG. 32C

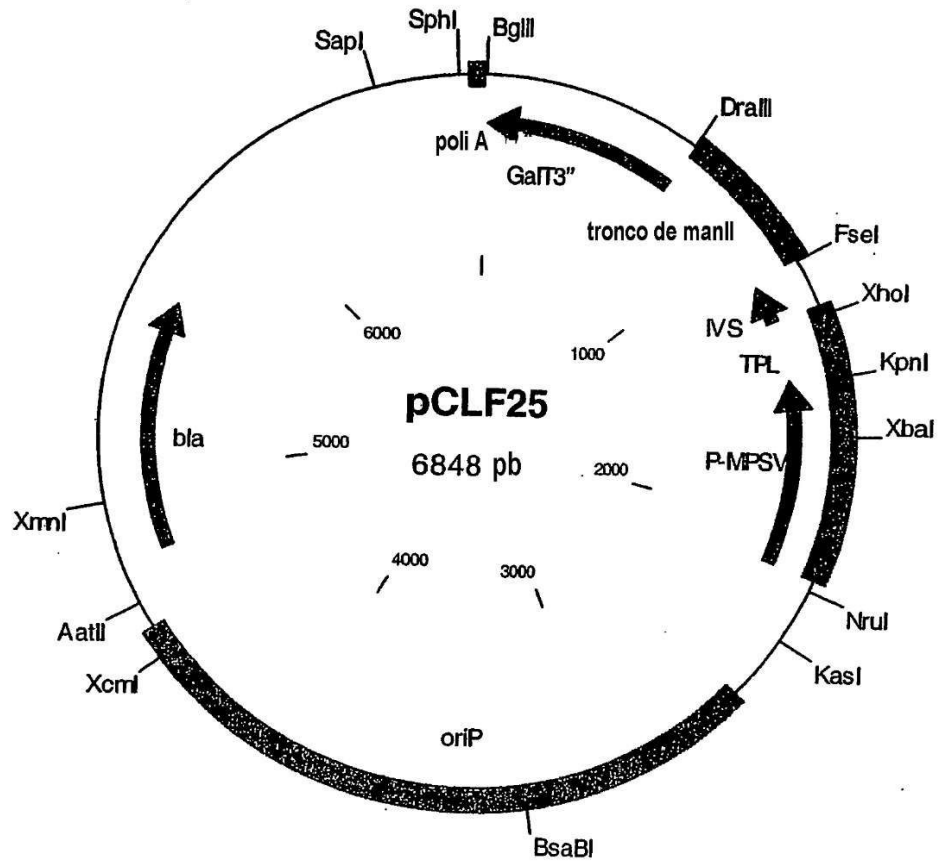


FIG. 33A

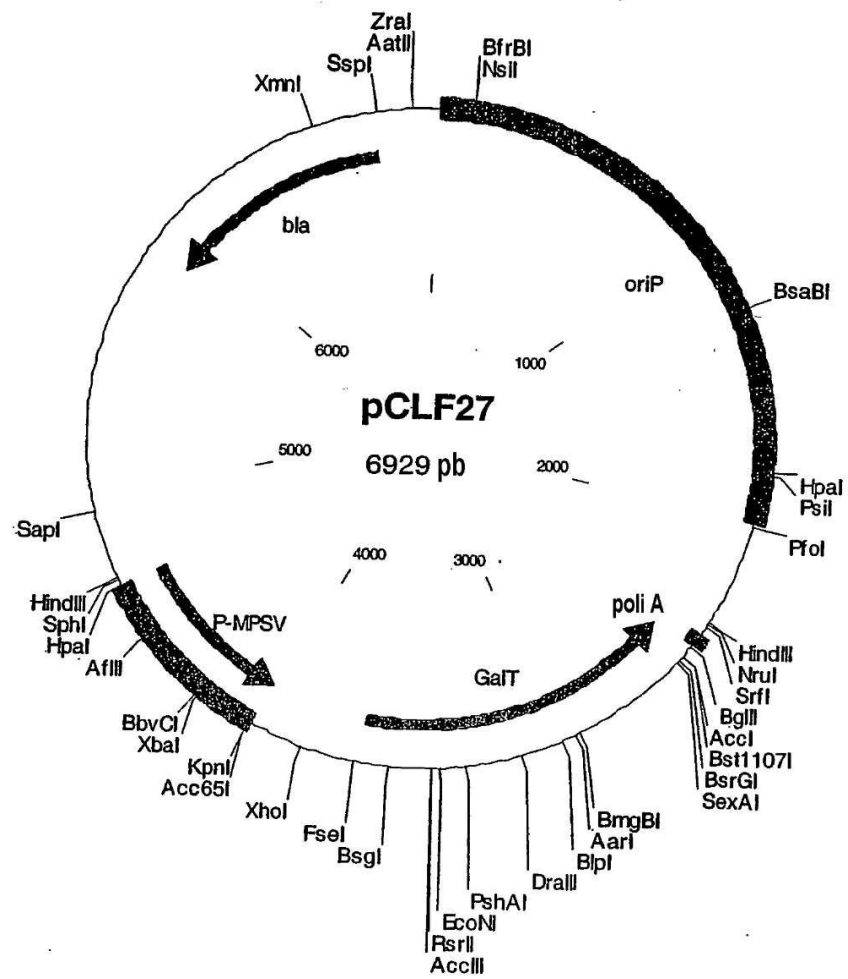
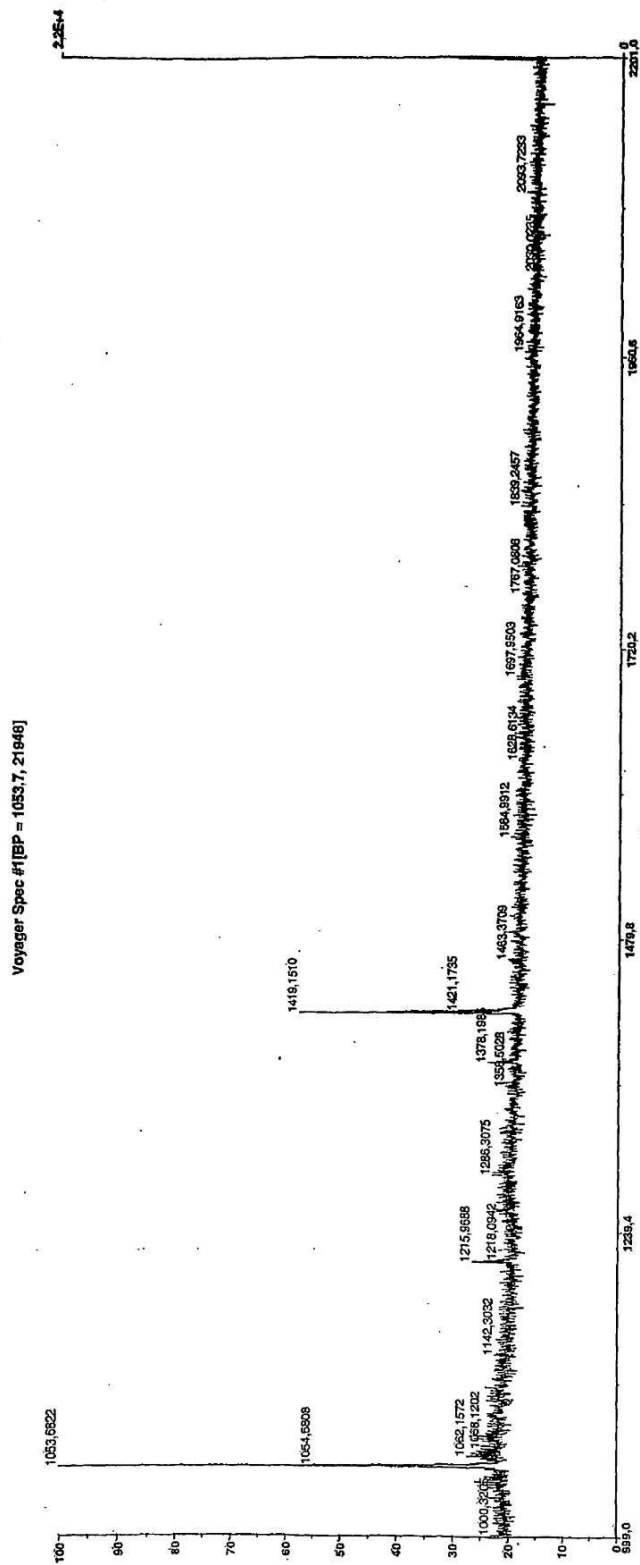


FIG. 33B







|      | pManil-GaIT | +EndoH  |
|------|-------------|---------|
| 1053 |             | 66,50%  |
| 1256 | 51,90%      |         |
| 1419 | 8,20%       | 33,50%  |
| 1581 | 7,00%       |         |
| 1622 | 30,00%      |         |
| 1769 | 2,90%       |         |
|      | 100,00%     | 100,00% |

FIG. 35B

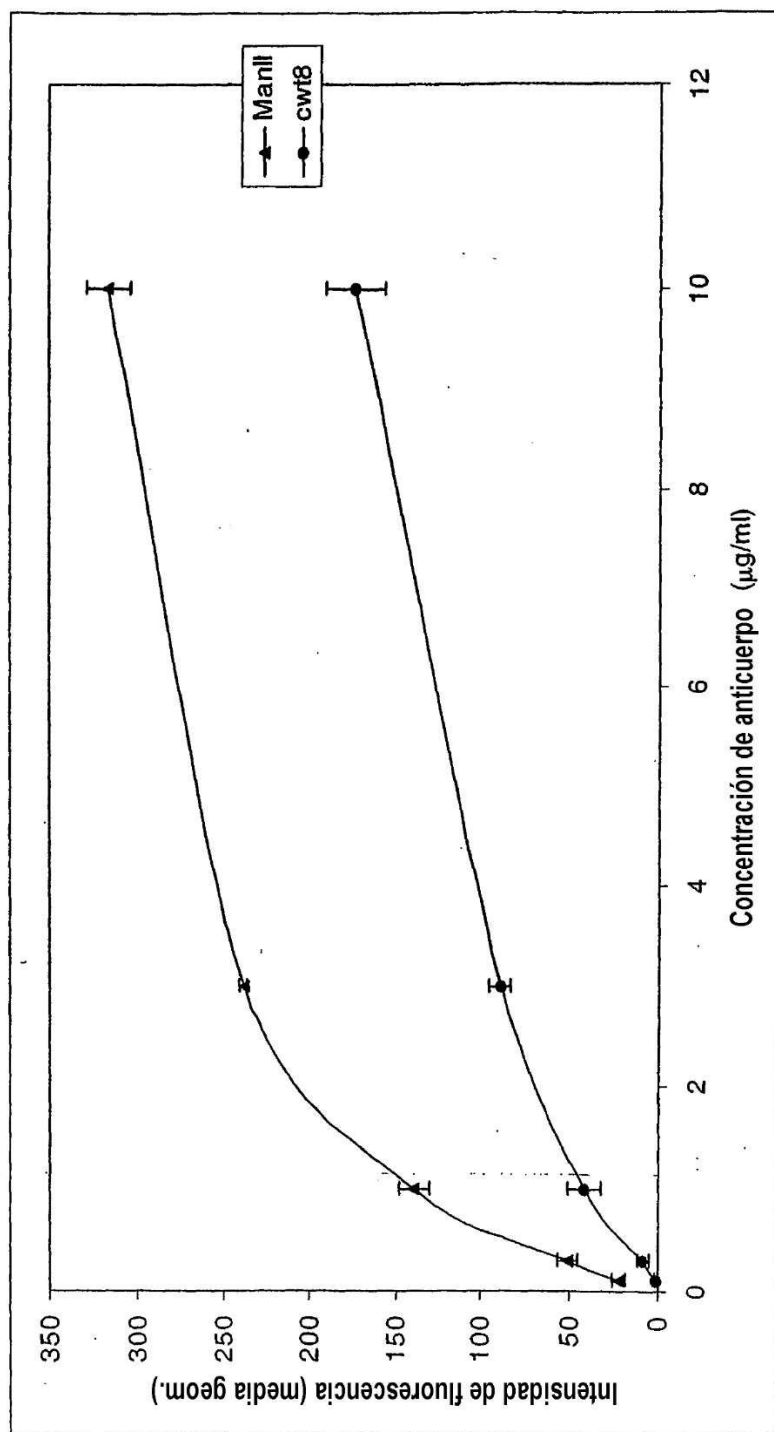


FIG. 36

ADCC mediada por anticuerpos IgG1 anti-CD20 quiméricos  
glicomodificados contra células diana SKW6.4

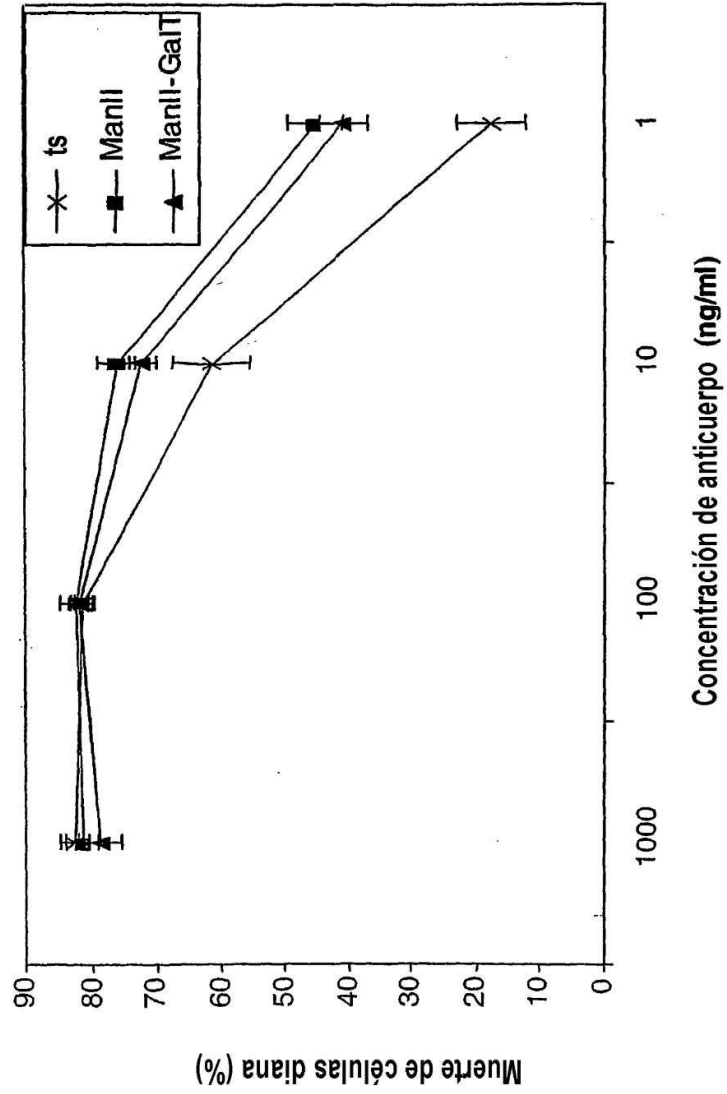


FIG. 37