

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 083**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06846120 .1**

96 Fecha de presentación: **20.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1945665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **TERAPÉUTICOS BASADOS EN ANTICUERPOS CON ACTIVIDAD ADCC MEJORADA.**

30 Prioridad:
21.10.2005 US 728947 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
**GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:
**MCPHERSON, John, M.;
EDMUNDS, Tim y
ZHOU, Qun**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

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).

ES 2 376 083 T3

DESCRIPCIÓN

Terapéuticos basados en anticuerpos con actividad ADCC mejorada

5 Campo técnico

[0001] El campo técnico de la invención de refiere de forma general a la glicobiología de proteínas y, más particularmente a la ingeniería o producción de anticuerpos así como a las implicaciones clínicas de la glicosilación en varias terapéuticos basados en anticuerpos como, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales y las proteínas de fusión Ig.

Antecedentes de la invención

[0002] Los terapéuticos basados en anticuerpos, es decir los anticuerpos monoclonales (mAbs) y las proteínas de Fusión Fc, han alcanzado ahora "la mayoría de edad" como terapéuticos. Hay por lo menos dieciocho mAbs y dos moléculas de fusión en el mercado y más de 150 están actualmente en pruebas clínicas (ver, por ejemplo, Holliger y otros (2005) Nature Biotech., 23: 1126-1136 y Theillaud (2005) Expert Opin. Biol. Ther., 5(Suppl. 1): S15-S27). Las indicaciones para estos terapéuticos son variadas e incluyen, por ejemplo, el trasplante de órganos (OKT3®, Simulect®, Zenapax®), la oncología (Rituxan®, Panorex®, Herceptin®, Mylotarg®, Campath®, Zevalin®, Bexxar®, Erbitux®, Avastin®, HuMax-CD4™), las enfermedades infecciosas (Synagis®), las enfermedades autoinmunes e inflamatorias, (Humira®, Amevive®, Enbrel®), y el asma alérgico (Xolair®). La actividad terapéutica de dichos fármacos puede ser mediada por diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, inhibiendo los eventos de señalización en las células objetivo, por inducción directa de la apoptosis, así como por mecanismos inmunológicos indirectos, como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) a través del enlace de los receptores Fc y la citotoxicidad dependiente de complemento a través del enlace al C1 q (ambos mecanismos son denominados colectivamente como "funciones efectoras").

[0003] Los mAbs de ratón fueron hechos primero por Köhler y otros en 1975 (Nature (1975) 256:495-497). El primer mAb que fue aprobado para uso clínico es un anticuerpo murino (OKT3®). Sin embargo, las funciones efectoras, la inmunogenicidad, y las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos de ratones (la mayoría de ellos siendo IgG1 o IgG2a y, en algunos casos, IgG2b) no son por lo general satisfactorias para usos terapéuticos en humanos. Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ratones se prueban con células de origen humano, el nivel de ADCC es sustancialmente más bajo que con las células de ratones. Estudios adicionales explican que las regiones Fc de los anticuerpos son responsables de las funciones efectoras, y que el ADCC reducido se debe a una menor afinidad de enlace de la región Fc de la IgG murino a los preceptores Fcγ en comparación con los anticuerpos humanos.

[0004] Se ha realizado un gran esfuerzo para producir terapéuticos basados en anticuerpos con inmunogenicidad disminuida y funciones efectoras optimizadas en humanos. Como resultado, se han desarrollado anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión basadas en anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos. La mayoría de los anticuerpos quiméricos y humanizados, así como las moléculas de fusión basadas en anticuerpos, contienen una región Fc derivada del IgG1 humano, porque esta subclase muestra características (enlace FcγRs, suero, vida media) y propiedades funcionales (ADCC, fagocitosis, endocitosis, activación complementaria) deseables para ciertos tipos de intervención inmune.

[0005] A pesar de que algunos terapéuticos basados en anticuerpos pueden funcionar sin utilizar mecanismos efectoras de anticuerpos, otros pueden necesitar reclutar al sistema inmunológico para matar las células objetivo. Si el reclutamiento dela sistema inmunológico es deseable par aun terapéutico particular, la ingeniería de la porción Fc de la IgG para mejorar la función efectora (por ejemplo enlace mejorado a los receptores de la IgG y/o el complemento) puede ser una mejora valiosa.

[0006] Se han explorado varias estrategias para mejorar el reclutamiento del sistema inmunológico, incluyendo; anticuerpos biespecíficos, en los que un brazo del anticuerpo enlaza con un receptor Fcγ (ver, por ejemplo, Segal y otros (1999) Curr. Opin. Inmunol., 11: 558-562); moléculas de fusión IgG-citocinas (por ejemplo, IL-10-Fc, IL-15-Fc), y la mutación de residuos de aminoácido responsables del enlace con el FcγRs (ver por ejemplo, Shields y otros (2001) J. Biol. Chem., 276:6591-6604).

[0007] La glicosilación de las inmunoglobulinas puede ser un determinante esencial para las funciones efectoras. Por lo tanto, otro enfoque para modificar la función efectora de una IgG particular es diseñar el patrón de glicosilación de la región Fc.

[0008] Una molécula de IgG contiene un oligosacárido N-vinculado enlazado covalentemente al Asn297 conservado de cada uno de los dominios CH2 en la región Fc. Los oligosacáridos encontrados en la región Fc del suero de las IgGs son mayoritariamente glicanos biantenarios del tipo complejo. Variaciones de los patrones de glicosilación de la IgG incluyen el enlace del ácido siálico terminal, un tercer brazo GlcNAc (GlcNAc bisector), una galactosilación terminal, y una fucosilación del nucleo α-1,6-enlazada. Los oligosacáridos pueden contener cero

(G0), una (G1), o dos (G2) galactosas (ver Figura 1A). EL patrón exacto de glicosilación depende de las propiedades estructurales de los subcomponentes de la IgG, en particular, de los dominios CH2 y CH3 (Lund y otros (2000) Eur. J. Biochem., 267: 7246-7257). Las líneas celulares usadas para producir nabs o moléculas de fusión de IgG recombinantes (más a menudo derivadas de líneas celulares de ratones y hámsteres) pueden también influir en la síntesis de las cadenas de oligosacáridos.

[0009] La fracción oligosacárida de las glicoproteínas es inicialmente sintetizada de los oligosacáridos lípido-enlazados para formar un $\text{Clc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -pirofosforilo-dolicol que es después transferido a la proteína en el retículo endoplásmico (ER) (ver Figura 1B). La parte oligosacárida es después procesada en la secuencia siguiente. Primero, los tres residuos de glucosa (Glc) son eliminados por glucosidasas I y II para producir la proteína $\text{Man}_9\text{ClcNAc}_2$. La estructura $\text{Man}_9\text{ClcNAc}_2$ puede ser adicionalmente procesada por la eliminación de un número de residuos de manosa (Man). Inicialmente, se eliminan cuatro manosas $\alpha 1,2$ -enlazadas para dar una $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína que es después alargada por la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Esta nueva estructura, la $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína, es el sustrato para la manosidasa II que elimina las manosas $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ -enlazadas. Después de esto, se añaden secuencialmente los otros azúcares, GlcNAc, la galactosa y el ácido siálico para dar los tipos complejos de estructuras que se encuentran a menudo en las glicoproteínas.

[0010] Varios estudios han investigado la relación entre las glicoformas de la IgG y las ADCC FC γ RIII-dependientes.

[0011] *Galactosa* - La Eliminación de la mayoría de los residuos de galactosa de la IgG1 mAB humanizada (Campath[®]) resultó en una actividad de lisis del complemento reducida pero no tuvo efecto en la ADCC (Body y otros (1995) Mol. Immunol., 32:1311-1318). Sin embargo, una forma altamente galactosilada de una IgG monoclonal anti-RhD humana es más activa en análisis ADCC que la forma agalactosilada (Kumpel y otros (1994) Antibodies Hybridomas, 5:143-151). Así el impacto de la galactosización del oligosacárido de la IgG en la ADCC es discutible.

[0012] *Ácido Siálico* - El ácido siálico terminal parece que no tiene efecto en la ADCC (Body y otros (1995) Mol. Immunol., 32:1311-1318).

[0013] *N-acetil-glucosamina* - Varios estudios se han concentrado en el papel del GlcNAc bisector en el enlace al Fc γ RII y a ADCC. El patrón de glicosilación de un anticuerpo antineuroblastoma de IgG1 quimérica ha sido diseñado en células de CHO transfectadas con β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) (Umana y otros (1999) Nature Biotech., 17:176-180; ver también la Patente U.S N° 6.602.684). Este enzima cataliza la adición del residuo del GlcNAc bisector al oligosacárido N-enlazado. El GlcNAc bisector bloquea la fucosilación del núcleo α -1,6-enlazado de los N-glicanos, ya que la α 1,6-fucosiltransferasa no puede usar eficientemente los N-glicanos bisectores como sustratos (Longmore y otros (1982) Carbohydrate Res., 100:365-392). La IgG producida en esta línea celular mostró una actividad ADCC aumentada. Sin embargo, la contribución del GlcNAc bisector en las funciones efectoras comparada con la de la fucosa central permanece discutida (Shinkawa y otros (2003) J. Biol. Chem., 278:3466-3473).

[0014] *Fucosa* - los mAbs quiméricos y humanizados se han producido en una línea celular hibridoma de rata que expresa un nivel más bajo de α -1,6-fucosiltransferasa, de tal forma que los mAbs segregados tienen menos oligosacárido fucosilado que el IgG1 de ovario de hámster Chino (CHO)-producido (Shinkawa y otros (2003) J. Biol. Chem., 278:3466-3473; ver también la Solicitud de Patente Europea N° de Publicación 1176195). Estos estudios han mostrado que los oligosacáridos no fucosilados juegan un papel más crítico en mejorar el ADCC que los oligosacáridos GlcNAc bisectores. Este informe es consistente con estudios anteriores en los que la deficiencia de fucosa del IgG1 no tuvo efecto en el enlace C1q, pero provocó un enlace aumentado en el Fc γ RIIIA humano y permitió una mayor actividad ADCC (Shields y otros (2002) J. Biol. Chem., 277:26733-26740).

[0015] Se han hecho intentos para diseñar líneas celulares que produzcan IgG recombinante con un patrón bien definido de glicosilación en la región Fc. Por ejemplo, se han hecho líneas celulares de CHO expresando altos niveles de β -1,4-galactosiltransferasa (GT) humana y/o α -2,3-sialiltransferasa. La estructura de los oligosacáridos de IgG producidos en estas células muestran una mayor homogeneidad en comparación con las líneas celulares de control. La sobreexpresión de GT reduce la cantidad de GlcNAc terminal, mientras que la sobreexpresión de ST aumenta la sialilación de los oligosacáridos (Weikert y otros (1999) Nature Biotech., 17:116-1121).

La US 2003/175969 describe un tratamiento de líneas celulares con DMM (desoximanojirimicina) para producir anticuerpos D antirhesus monoclonales caracterizado por la presencia de la forma oligomanosa (man 5,6 y 7) y citotoxicidad dependiente de anticuerpos mejorada (ADCC).

Rothman R J y otros: "La citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células asesinas naturales se mejora por las alteraciones inducidas por la castanospermina de la glicosilación de la IgG"; Molecular Immunology, vol. 26, N° 12, Diciembre de 1989 (1989-12), páginas 1113-1123 revela el tratamiento de hibridomas con la castanospermina inhibidora de glucosidasa o el DMM inhibidor de 1,2 manosidasa I para producir anticuerpos murinos con ADCC aumentada.

Ko K y otros: "Función y glicosilación del anticuerpo monoclonal antiviral derivado de plantas"; Proceeding of the National Academy of Sciences USA, vol 100, N° 13, 24 de Junio del 2003, páginas 8013-8018 revela la producción

de anticuerpo antirrábico humano en las plantas de tabaco transgénicas que contiene un 90% de oligosacáridos del tipo oligomanosa.

Wright A y otros: "Efecto de la estructura de carbohidratos C2-asociada en la función efectora del Ig: estudios con anticuerpos IgG1 ratón-humano quiméricos en mutantes de la glicosilación de células ováricas del hámster Chino": Journal of Immunology vol. 160, N° 7, 1 de Abril de 1998, páginas 3393-3402 describe la producción de IgG1 ratón-humano en células de CHO deficientes en la N-acetilglucosaminiltransferasa I.

Zhu Lei y otros: "Producción de anticuerpo monoclonal humano en huevos de pollos quiméricos"; Nature Biotechnology, vol. 23, N° 9, 28 de agosto del 2005, páginas 1159-11699 describe la producción de anticuerpos completamente humanos en la glándula tubular de los pollos. El anticuerpo contiene oligosacáridos del tipo alta manosa y carece del ácido siálico terminal y de residuos de fucosa.

[0016] Continúa habiendo una necesidad de optimizar los terapéuticos basados en anticuerpos, y en particular, de desarrollar métodos para producir terapéuticos basados en anticuerpos con actividad ADCC mejorada.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0017] La invención proporciona métodos para hacer anticuerpos y proteínas de fusión Fc terapéuticos con actividad ADCC mejorada y métodos de uso de tales terapéuticos. La invención pertenece a los terapéuticos basados en anticuerpos que son completamente humanos, o por otro lado contienen el dominio Fc de los anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos y moléculas de fusión FC humanas, humanizadas o quiméricas con un dominio Fc humano o un derivado funcional de los mismos. En las realizaciones preferidas, el dominio Fc es de la IgG, y más preferiblemente d, de la IgG1.

[0018] Los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc hechas por los métodos de la invención comprenden N-glicanos del tipo oligomanosa y están además caracterizados por una o más de las siguientes propiedades (en comparación con los mismos anticuerpos o proteínas de fusión Fc que contienen N-glicanos del tipo complejo):

- (a) mayor actividad ADCC;
- (b) mayor afinidad de enlace para el FcγRIIIA (y otros ciertos receptores Fcγ);
- (c) especificidad de enlace similar o mayor para el objetivo;
- (d) afinidad de enlace similar o mayor para el objetivo; y
- (e) afinidad de enlace similar o menor para el receptor de manosa.

[0019] Los N-glicanos del tipo oligomanosa en los anticuerpos y las moléculas de fusión Fc de la invención comprenden Man₆₋₉(GlcNAc)₂. Dichos N-glicanos no contienen ácido siálico terminal, galactosa, o GlcNAc. En las realizaciones preferidas, dichos N-glicanos no contienen fucosa del núcleo. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo o las composiciones de proteína de fusión de FC de la invención contienen predominantemente Man₉(GlcNAc)₂ con cantidades menguantes de los oligosacáridos del tipo oligomanosa Man₈(GlcNAc)₂, Man₇(GlcNAc)₂, Man₆(GlcNAc)₂, y Man₅(GlcNAc)₂, mientras que contienen cantidades menores o indetectables de N-glicanos del tipo complejo y/o del tipo híbrido.

[0020] Un método de hacer un anticuerpo o proteína de fusión Fc revelado en la presente comprende:

- (a) proporcionar una ingeniería celular para expresar el anticuerpo o la proteína de fusión Fc;
- (b) cultivar la célula bajo condiciones que resultan en la secreción del anticuerpo o de la proteína de fusión Fc que comprende N-glicanos del tipo oligomanosa; y
- (c) recuperar el anticuerpo o proteína de fusión Fc segregados.

[0021] Otro método de hacer un anticuerpo o proteína de fusión Fc revelado en la presente comprende:

- (a) Proporcionar una ingeniería celular para expresar el anticuerpo o la proteína de fusión Fc;
- (b) cultivar la célula bajo condiciones que resultan en la expresión del anticuerpo o de la proteína de fusión Fc que comprende N-glicanos del tipo oligomanosa; y
- (c) recuperar el anticuerpo o proteína de fusión Fc expresados.

[0022] En las realizaciones preferidas, la célula diseñada es una célula de mamífero, por ejemplo una célula de CHO, una célula de NSO, o una célula de hibridoma de ratón. La célula diseñada puede ser deficiente en una o más de las glicosidasas requeridas para el procesamiento de las primeras etapas de los N-glicanos y/o las condiciones de cultivo pueden ser tales que la actividad de uno o más de estas glicosidasas es inhibida. Por ejemplo, la célula puede ser deficiente en una o más glicosidasas seleccionadas del grupo consistente de α-glucosidasa I, α-glucosidasa II, y α-manosidasa I. Además, o alternativamente, la célula diseñada revelada en la presente puede estar en contacto con un inhibidor o una o más glicosidasas seleccionadas del grupo consistente de α-glucosidasa I, α-glucosidasa II, y α-manosidasa I. El inhibidor puede ser el inhibidor de la α-manosidasa I, por ejemplo, de acuerdo a la invención el inhibidor específico de la α-manosidasa I, la kifunensina.

[0023] También son revelados métodos para matar una célula objetivo en un mamífero administrando una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención a un mamífero por la que el anticuerpo interviene en la muerte de la célula objetivo por medio de la ADCC. Los métodos para matar una célula objetivo incluyen métodos de tratar enfermedades en los que es deseable la muerte dirigida por anticuerpos

de las células objetivo, por ejemplo, varios tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, y enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0024] La **Figura 1a** muestra una representación esquemática de varias glicoformas de la IgG. Los residuos de azúcar del carbohidrato de la IgG unidos al Asn297 incluyen la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la manosa, la galactosa, la fucosa y el ácido siálico (NeuAc). Las variaciones en las glicoformas de la IgG dependen de la unión de la galactosa, residuos de NeuAc y de la GlcNAc bisector al núcleo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$. Los N-glicanos pueden contener cero (G0), uno (G1) o dos (G2) residuos de galactosa, así como una fucosa unida a la primera GlcNAc en el final de reducción (marcado como G0F, G1F, G2F, respectivamente). Sin embargo, los N-glicanos principales encontrados en los anticuerpos recombinantes expresados de la mayoría de las líneas celulares mamíferas son los G0f y G1F.

[0025] La **Figura 1B** ilustra la inhibición del sistema de glicosilación N-enlazado usando varios inhibidores. El procesamiento de los N-glicanos en un anticuerpo puede ser inhibido por inhibidores específicos para las glicosidasas o las glicotransferasas en el lumen del ER o del Golgi. OT representa la oligosacariltransferasa; Clcase I & II representa las α -glucosidasas I y II; las Manasas I & II representa las α -manosidasas I y II; GnT I & II representa las GlcNAc transferasas I y II; FT representa la α -1,6 fucosiltransferasa; y GT representa la β -1,4 galactosiltransferasa.

[0026] La **Figura 1C** recoge el alineamiento de las secuencias nativas de los dominios Fc de la IgG humana con diferencias entre las secuencias de varios isotipos de IgG marcados con asteriscos.

[0027] La **Figura 2** muestra el resultado de una transferencia de SDS-PAGE, lectina y anticuerpo de TEM mAb A purificado. Se aplicaron las alícuotas de 5 μg de muestras de TEM mAb A en regulador de muestra reducido a cada pocillo de un 4-20% de gel SDS-PAGE y el gel fue teñido con Azul de Coomassie (**Figura 2A**). La pista 1 representa IgG1 de células tratadas sin ningún inhibidor; la pista 2 representa IgG1 de células tratadas con manoestatina A; la pista 3 representa IgG1 de células tratadas con kifunensina; la pista 4 representa IgG1 de células tratadas con NB-DNJ. La **Figura 2B** muestra los resultados de la transferencia de lectina de varios anticuerpos. Las proteínas (0,5 μg por muestra) fueron separadas por SDS-PAGE como se describe para la Figura 2A, y fueron transferidas a una membrana PVDF. La membrana fue transferida con lectina lentin biotinilada y desarrollada con estreptavidina-HRP. La **Figura 2C** muestra la misma membrana que en la Figura 2B que se despegó y se re-transferió usando anticuerpo Fab anti-humano conjugado con HRP.

[0028] La **Figura 3** muestra los resultados de un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de los carbohidratos de los anticuerpos TEM. Los carbohidratos en TEM mAb A de células tratadas sin el inhibidor (A), con manoestatina A (B), kifunensina (C) y NB-DNJ (D) y los carbohidratos en el TEM mAb B de células tratadas sin el inhibidor (E) y con kifunensina (F) fueron analizados usando el análisis MS MALDI-TOF.

[0029] La **Figura 4** muestra resultados de un perfil HPLC de N-glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico en el TEM mAb B de células tratadas con kifunensina o sin la misma. Los perfiles HPLC de N-glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico en el TEM mAb B de células tratadas con o sin kifunensina en comparación con varios estándares de N-glicano (A). Los perfiles de HPLC de N-glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico en el TEM mAb B de células tratadas con kifunensina antes y después del tratamiento Endo H (B).

[0030] La **Figura 5** muestra la actividad ADCC del TEM mAb de células tratadas con inhibidores. (A) La actividad ADCC del TEM mAb A de células tratadas sin inhibidor (control) o con manoestatina A (inhibidor #1), kifunensina (inhibidor #2), NB-DNJ (inhibidor #3). (B) actividad ADCC del TEM mAb A de células tratadas sin (control) o con kifunensina en varias concentraciones de anticuerpos. (C) actividad ADCC del TEM mAb B de células tratadas con kifunensina (control) o con kifunensina. El anti-DNP fue incluido en los ensayos como un control negativo.

[0031] La **Figura 6A** muestra el TEM mAb A enlazando a las células objetivo por análisis de citometría de flujo. Los anticuerpos de las células tratadas sin inhibidor se etiquetan como control, mientras que los anticuerpos de las células tratadas con manoestatina A (inhibidor #1), kifunensina (inhibidor #2), y NB-DNJ (inhibidor #3) se etiquetan como tales. La **Figura 6B** muestra el TEM mAb enlazando a las células objetivo por análisis de citometría de flujo. Los anticuerpos TEM eran de células tratadas sin (control) o con kifunensina, mientras que el anti-DNP fue también incluido como control negativo.

[0032] La **Figura 7** muestra los resultados de un análisis de resonancia de plasmones de superficie de la interacción entre el Fc γ RIIIA (Val 158) humano soluble y los anticuerpos producidos de células tratadas con kifunensina y células no tratadas. La región de interés fue extendida para mostrar el flujo de Fc γ RIIIA.

[0033] La **Figura 8** demuestra la interacción del dominio que enlaza con el carbohidrato del receptor de manosa con los anticuerpos de células tratadas con o sin kifunensina. El enlace del TEM mAb B de células de CHO tratadas

con o sin kifunensina al dominio que enlaza con el carbohidrato del receptor de manosa se midió usando BIAcore™. La glicoproteína terminada en manosa ("glicoproteína Man3") se usó como control positivo.

[0034] La **Figura 9** muestra los resultados de un análisis farmacocinético del TEM mAb B de células de CHO tratadas con o sin kifunensina. El TEM mAb B de células de CHO tratadas con o sin kifunensina fue inyectado en ratones y se midió la cantidad de anticuerpos en suero recogidos en varios puntos de tiempo usando ELISA.

[0035] La **Figura 10A** ilustra la viabilidad de las células de CHO que expresan TEM mAb B cultivadas en frascos de agitación en medio con de 0 a 2 µg/ml de kifunensina (1 ó 3 tratamientos). La **Figura 10B** ilustra la densidad celular de las células de CHO que expresan TEM mAb B cultivadas en medio con o sin de 0 a 2 µg/ml de kifunensina (1 ó 3 tratamientos). El tratamiento 3xse indica como "sup." En las Figuras 10A y 10B.

[0036] La **Figura 11** muestra los resultados de un análisis de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF) de los carbohidratos de los anticuerpos TEM de las células de CHO tratadas con varias cantidades de kifunensina durante 11 días. Los carbohidratos en el TEM mAb B de las células tratadas sin kifunensina (**Figura 11A**) o con las siguientes adiciones de kifunensina como sigue: (**Figura 11B**) 0,5 µg/ml una vez, (**Figura 11C**) 1 µg/ml una vez, (**Figura 11D**) 1,5 µg/ml una vez, (**Figura 11E**) 2 µg/ml una vez, (**Figura 11F**) 0,5 µg/ml tres veces, (**Figura 11G**) 1 µg/ml tres veces, (**Figura 11H**) 1,5 µg/ml tres veces, y (**Figura 11I**) 2 µg/ml tres veces (ver Figura 10). Los carbohidratos en el TEM mAb A de células tratadas sin inhibidor (**Figura 11J**) o 2 µg/ml de kifunensina durante 11 días (**Figura 11K**) (ver también la Figura 12).

[0037] La **Figura 12A** ilustra la viabilidad de las células CHO que expresan TEM mAb A cultivadas en un medio con o sin 2 µg/ml de kifunensina durante 11 días (un único tratamiento en 1L de cultivo con agitación centrífuga). La **Figura 12B** ilustra la densidad celular de células de CHO que expresan TEM mAb A en un medio con o sin 2 µg/ml de kifunensina (única adición).

[0038] La Figura 13 muestra la actividad ADCC del anticuerpo C expresada por células HEK293 tratadas con o sin kifunensina. Se usó el PCMC humano como células efectoras, y las células que expresaron el antígeno reconocido por el anticuerpo C fueron usadas como células objetivo a tasa de célula efectora a célula objetivo de 50:1 (**Figura 13A**) y de 100:1 (**Figura 13B**). La IgG fue usada como un control de anticuerpos no específicos.

[0039] La **Figura 14** ilustra los resultados en un análisis de resonancia de plasmones de superficie de la interacción entre el FcγRIIIA (Val158) y el anticuerpo C de las células HEK293 tratadas con o sin kifunensina. El FcγRIIIA humano soluble fue capturado en el chip sensor, y se midió el enlace del anticuerpo C con el FcγRIIIA inmovilizado.

[0040] La **Figura 15** muestra los resultados de un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de carbohidratos del TEM mAb A de células de CHO no tratadas con kifunensina (**Figura 15A**) o de células de CHO tratadas con Kifunensina a 4 ng/ml (**Figura 15B**), 20 ng/ml (**Figura 15C**), 100 ng/ml (**Figura 15D**), 500 ng/ml (**Figura 15E**) y 2500 ng/ml (**Figura 15F**).

[0041] La **Figura 16** muestra los resultados de un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de carbohidratos de TEM mAb A de células de CHO tratadas con varias cantidades de kifunensina: 20 ng/ml (**Figura 16A**), 40 ng/ml (**Figura 16B**), 60 ng/ml (**Figura 16C**), 80 ng/ml (**Figura 16D**), y 100 ng/ml (**Figura 16E**).

[0042] La **Figura 17** muestra la actividad ADCC del TEM mAb A de células de CHO tratadas con varias cantidades de kifunensina. La **Figura 17A** muestra la actividad ADCC del anticuerpo expresado en la ausencia de kifunensina o en la presencia de 2500 ng/ml de kifunensina. El anticuerpo anti-DNP fue incluido como un control negativo. La **Figura 17B** muestra la actividad ADCC del mismo anticuerpo de células tratadas con 20, 40, 60, 80 y 100 ng/ml de kifunensina.

[0043] La **Figura 18** ilustra la relación entre el porcentaje de glicanos no fucosilados y la citotoxicidad específica en tres concentraciones de anticuerpos (0,006, 0,06, y 0,55 µg/ml). El porcentaje de glicanos no fucosilados fue estimado calculando el área de cada máximo glicano individual in el espectro MS MALDI-TOF.

[0044] La **Figura 19** muestra los resultados de ensayos de formato ELISA usados para evaluar el enlace de varios FcγRs con el anticuerpo D de células tratadas con kifunensina o de células no tratadas. La **Figura 19A** muestra el enlace del anticuerpo con el FcγRIA. La **Figura 19B** muestra el enlace del anticuerpo D con el FcγRIIA. La **Figura 19C** muestra el enlace del anticuerpo D con el FcγRIIB.

BREVE DESCRIPCION DE LAS SECUENCIAS

[0045] Las SEQ ID NO:1, 2, 3 y 4 son secuencias de aminoácidos de los dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humanas, respectivamente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0046] En los experimentos descritos en los Ejemplos, las células de CHO e hibridomas diseñadas para expresar anticuerpos fueron cultivadas en la presencia del inhibidor α -manosidasa I, kifunensina. EL tratamiento de las células con kifunensina resultó en la producción de anticuerpos que transportaban N-glicanos del tipo oligomanosa, mientras que la formación de N-glicanos del tipo complejo se bloqueo. Los anticuerpos que transportaban glicanos del tipo oligomanosa mostraron actividad ADCC aumentada en comparación con los mismos anticuerpos producidos con el tratamiento de kifunensina. Así, los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc que transportaban N-glicanos del tipo oligomanosa son útiles para varias terapias en las que es deseable la muerte dirigida por Fc de las células objetivo.

[0047] En consecuencia, la invención proporciona métodos para hacer anticuerpos terapéuticos y proteínas de fusión Fc con actividad ADCC aumentada, y métodos para usar dichos terapéuticos.

[0048] Un aspecto de la invención proporciona un método de producir un anticuerpo monoclonal glicosilado o proteína de fusión Fc que tiene al menos un 70% de N-glicanos de $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$, y un 10% o menos de N-glicanos complejos, por relación molar, en relación a todos los N-glicanos, que comprende:

- (a) proporcionar un anticuerpo monoclonal que produce una célula mamífera o una proteína de fusión Fc que produce una célula mamífera
- (b) cultivar la célula en la presencia de kifunensina; y
- (c) recuperar el anticuerpo glicosilado o la proteína de fusión Fc.

[0049] Alternativamente, los anticuerpos que comprenden N-glicanos del tipo oligomanosa pueden ser producidos por enlace químico de un anticuerpo o célula de fusión no glicosilado y una fracción de oligosacárido sintetizada separadamente.

Anticuerpos y proteínas de fusión Fc

[0050] Los anticuerpos pertenecen a la clase de proteínas conocidas como inmunoglobulinas. Los anticuerpos intactos son típicamente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas de aproximadamente 50 kDa cada una. Dependiendo de la secuencia de amino ácido del dominio constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos pueden ser asignados a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varios de estos pueden ser además divididos en subclases (isotipos), por ejemplo, en humanos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2, etc. Las cadenas pesadas y ligeras contienen cada una, una región constante C-terminal, común a todos los anticuerpos de un isotipo particular, y una región variable N-terminal que contiene la especificidad de enlace al anticuerpo. El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos monoclonales sin tener en cuenta su fuente o método de producción, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoespecíficos, poliespecíficos, (por ejemplo biespecíficos), humanizados, humanos, quiméricos, recombinantes, híbridos, mutados, y CDR injertados. Por ejemplo, el Rituxan®, el Simulect®, el Remicade®, y el Erbitux® son anticuerpos quiméricos; el Campath®, el Zanapax®, el Synagis®, el Herceptin®, el Mylotarg®, el Xolair®, y el Avastin® son anticuerpos humanizados; y el Humira® y el Humax-CD4™ son anticuerpos completamente humanos. También incluye porciones de moléculas de anticuerpo, como los scFvs, mientras dichas moléculas estén enlazadas a una región Fc de una Inmunoglobulina. El término "anticuerpo policlonal", como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales producidos recombinantemente. Los anticuerpos policlonales pueden ser usados en los métodos y composiciones de la invención de manera similar a otros anticuerpos como se describe en la presente.

[0051] Los métodos rutinarios de hacer anticuerpos de estos varios tipos son bien conocidos y están descritos en, por ejemplo, Antibody Engineering por Borrebaeck (editor), Oxford University Press, 2ª ed., 1995; Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) por Lo (ed.), Humana Press, 2003; y Antibody Engineering (Springer Lab Manuals) por Kontermann y otros (eds.), Springer; 1ª ed., 2001.

[0052] Los términos "dominio Fc", "porción Fc", y región Fc se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo humano, por ejemplo, de alrededor de aminoácido (aa) 230 a alrededor de aa 447 de cadena y o su secuencia de contrapartida en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpos (por ejemplo, α , δ , ϵ , y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo de origen natural de los mismos. A menos que se especifique lo contrario, la numeración de aminoácido Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas se usa a lo largo de esta divulgación (ver Kabat y otros (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª ed. United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD). Los términos "dominio Fc no humano", "porción Fc no humana", y "región Fc no humana" se refieren al fragmento C-terminal correspondiente de una cadena pesada de anticuerpo no humano (por ejemplo de ratón, rata, cabra o conejo). Los dominios de Fc no humanos pueden ser usados en los métodos y composiciones de la invención de manera similar a los dominios Fc como se describe en la presente.

[0053] La Figura 1C ilustra un alineamiento de dominios Fc humanos de la IgG1 (SEQ ID NO:1), la IgG2 (SEQ ID NO:2), la IgG3 (SEQ ID NO:3), y la IgG4 (SEQ ID NO:4). El alineamiento muestra alrededor de un 91-94% de

identidad entre estos dominios Fc. Una comparación de los dominios Fc humanos con los dominios Fc de ratón de las IgG1, IgG2A, IgG2B, e IgG3 revela identidad de alrededor del 61-68%.

[0054] Los receptores Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (FcγRs) median la función efectora celular de los anticuerpos de IgG. Un subconjunto de residuos de aminoácido en la región Fc está involucrado en el enlace con los FcγRs. Se ha demostrado que las variantes de secuencia de aminoácidos que muestran enlace aumentado con el FcγRIII también poseen actividad ADCC aumentada (Shields y otros (2001) J. Biol. Chem., 276:6591-6604). Para el FcγRIIIA humano, este subconjunto incluye, por ejemplo, los siguientes: (1) Lys274-Arg-301 y Tyr407-Arg416 (Sarmay y otros (1984) Mol. Immunol., 21:43-51 y Gergely y otros (1984) Biochem. Soc. Tans., 12: 739-743); (2) Leu234-Ser239, Asp265-Glu-269, Asn297-Thr299, y Ala327-Ile332 (Sondermann y otros (2000) Nature, 406:267-273, y (3) T256, K290, S298, E333, K334, A339 (Shields y otros (2001) J. Biol. Chem., 276:6591-6604; ver también las variantes reveladas en la Solicitud de Patente U.S. N° 2004/0228856). Por ejemplo, las variantes Fc T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, A339T han sido descritas como teniendo actividad ADCC mejorada en comparación con las secuencias nativas (ver, por ejemplo, Shields, supra). Además, un número de aminoácidos puede ser mutado son ninguna pérdida de la función ADCC.

[0055] Por consiguiente, los dominios Fc diseñados pueden contener sólo una secuencia de aminoácido parcial o mutada de los dominios Fc de origen natural, por ejemplo, como se ha especificado anteriormente. Por lo tanto, para los propósitos de la presente divulgación, los términos "dominio Fc" y sus cognados se refieren no sólo a las formas de origen natural si no también a los dominios Fc diseñados. Por ejemplo, un dominio Fc puede comprender una secuencia, que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, o un 100% idéntica a la SEQ ID NO:n sobre la longitud total de la SEQ ID NO:n, en donde $n = 1, 2, 3, \text{ ó } 4$.

[0056] En los métodos de la invención, los terapéuticos basados en anticuerpos son completamente humanos, o de otra manera contienen el dominio Fc de los anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos y células de fusión Fc humanizados o quiméricos con un dominio Fc humano o un derivado funcional de los mismos (por ejemplo, un derivado que enlaza con uno o más de los receptores Fc, por ejemplo el FcγRIIIA). Los derivados incluyen, por ejemplo, secuencias nativas en las que se han hecho las sustituciones conservativas y/o los aminoácidos no esenciales han sido borrados.

[0057] En las realizaciones preferidas, los anticuerpos o la porción Fc se deriva de la IgG1. Sin embargo, la invención se puede practicar con otras clases de anticuerpos, incluyendo la IgG, la IgA, la IgD, la IgE y la IgM, e isotipos, como, por ejemplo, la IgG1, la IgG2, la IgG3, la IgG4, la IgA1, y la IgA2. Por ejemplo, la IgG4 tiene una capacidad limitada para activar las funciones efectoras, mientras las IgAs son potentes activadoras del ADCC. En ambos casos, la actividad ADCC de los anticuerpos o las moléculas de fusión Fc pueden ser aumentadas usando métodos de la invención.

[0058] La especificidad del anticuerpo hacia su antígeno o la especificidad de la porción no Fc y la proteína de fusión Fc para su objetivo varían dependiendo de los requisitos de una aplicación particular. Por ejemplo, el Enbrel® contiene un dominio receptor-enlazante de un receptor TNF (p75), y el Amevive® contiene un dominio CD2-enlazante de LFA-3, cada uno fusionado a un dominio Fc humano. Por ejemplo, el dominio Fc puede estar vinculado a un enzima, a una toxina, a un factor de crecimiento, a una quimioterapia, o citocina. Además, las proteínas de fusión Fc pueden contener una región bisagra anticuerpo y/o un enlazador.

Células y Condiciones de Cultivo

[0059] En algunos métodos de la invención, se proporciona una célula diseñada para expresar un anticuerpo o fusión Fc. En las realizaciones preferidas, la célula diseñada se propaga en el medio de cultivo (por ejemplo, en oposición a ser una parte de un animal vivo ("in vivo")). Por ejemplo, la célula puede ser una célula mamífera, por ejemplo una célula de CHO o una célula humana o una célula de hibridoma de ratón. Ejemplos de otros tipos de células que pueden ser usadas para la expresión de los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc incluyen las células de mieloma de ratón (por ejemplo, NS0=, células de riñón embrionarias humanas (por ejemplo, HEK293), células de riñón de mono (por ejemplo, COS), células de carcinoma epitelial humanas (por ejemplo, HeLa), células de fibrosarcoma humanas (por ejemplo, HT-1080), células de riñón de hámster bebé, y otras (ver, por ejemplo, Fernandez y otros (eds) Gene Expression Systems, Academic Press, 1999). Se pueden usar cualquier célula compatible con la presente invención y condiciones de cultivo apropiadas.

[0060] La célula diseñada puede ser deficiente en uno o más glicosidasas requeridas para el procesamiento de las primeras etapas de los N-glicanos y/o las condiciones de cultivo pueden ser tales que la actividad de una o más de estas glicosidasas se inhibe. Como resultado de una o ambas de estas condiciones, la síntesis del oligosacárido se desvía hacia las especies del tipo oligomanosa.

[0061] Por ejemplo, la célula puede ser deficiente en una o más glicosidasas seleccionadas del grupo consistente de α -glucosidasa I, α -glucosidasa II, y α -manosidasa I. Las células deficientes en una glicosidasa de interés pueden ser diseñadas usando métodos como se ha descrito, por ejemplo, en Tymms y otros (eds.) Gene Knockout Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 1ª ed., 2001; y en Joyner (ed.) Gene Targeting: A Practical

Approach, Oxford University Press, 2ª ed., 2000. Por ejemplo, las células deficientes en glicosidasa pueden ser diseñadas usando la selección de lectina como se ha descrito en Stanley y otros (1975) *Biochemistry*, 72(9):3323-3327.

5 **[0062]** Además, o alternativamente, la célula diseñada puede ponerse en contacto con un inhibidor de una o más glicosidasas seleccionadas del grupo consistente de α -glucosidasa I, α -glucosidasa II, y α -manosidasa I. Los inhibidores de estas enzimas pueden ser, por ejemplo, moléculas pequeñas o ARNs interferentes pequeños (siRNAs).

10 **[0063]** Los siRNAs son ARNs de cadena doble cortos (20-25 nt) que inhiben una glicosidasa de interés por el silenciamiento de genes post-transcripcional. Se puede preparar y usar un siRNA específico de glicosidasa como se describe en la Patente U.S. Nº 6.506.559 y/o usando otros métodos adecuados (ver, por ejemplo, Appasanl (ed.) *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, 1ª ed., 2005; y Uel-TI y otros (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32(3):936-94.8.

15 **[0064]** Ejemplos de inhibidores de la α -glucosidasa I de molécula pequeña incluyen la castanospermina (Pan y otros (1983) *Biochemistry*, 22:3975-3984, la desoxinojirimicina (DNJ; Hettkamp y otros (1984) *Eur. J. Biochem.*, 142:85-90) y los derivados N-alquilo y N-alquenilo de los mismos (por ejemplo, N-butilo-DNJ); 2,5-dihidrometil-3,4-dihidroxipirrolidina (DMDP; Elbein y otros (1984) *J. Biol. Chem.*, 259:12409-12413; y la australina (Molyneux y otros (1988) *J. Nat Prod.*, 51:1198-1206).

20 **[0065]** Ejemplos de inhibidores de la α -glucosidasa II de molécula pequeña incluyen la DNJ y los derivados N-alquilo y N-alquenilo derivados de la misma, y el MDL 25637 (Hettkamp y otros (1984) *Eur. J. Biochem.*, 142:85-90; Kaushal y otros (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 17278-17283).

25 **[0066]** Ejemplos de inhibidores de la α -manosidasa I de molécula pequeña incluyen, desoximanojirimicina (DMJ; Legler y otros (1984) *Carbohydr. Res.*, 128:61-72) y derivados de la misma (por ejemplo) derivado N-metil como se describe en Bosch y otros (1985) *Virology*, 143:342-346), 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-manitol (DIM; Fleet y otros (1984) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1240-1241 y Palmarzyk y otros (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, 243:35-45) y la kifunensina (Elbein (1990) *J. Biol. Chem.*, 265:15599-16605).

30 **[0067]** De acuerdo a la invención, las células diseñadas son cultivadas en la presencia de un inhibidor de la α -manosidasa I, la kifunensina. En ciertas realizaciones, la kifunensina puede ser usada a una concentración de 0,01 a 100 μ g/ml, 0,01 a 75 μ g/ml, 0,01 a 50 μ g/ml, 0,01 a 40 μ g/ml, 0,01 a 30 μ g/ml, 0,01 a 20 μ g/ml, 0,1 a 10 μ g/ml, 0,1 a 2,0 μ g/ml, o 1 a 0,5 μ g/ml durante un periodo de al menos 12, 24, 48, 72 horas ó 4, 7, 10, 20 días o más tiempo, o continuamente. En realizaciones ilustrativas no limitativas, las células de CHO o hibridoma se incuban con alrededor de 0,5-10 μ g/ml de kifunensina durante más de 10 días.

Características de los Anticuerpos Producidos

40 **[0068]** Los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc hechas por los métodos de la invención comprenden los N-glicanos del tipo oligomanosa y están además caracterizados por una o más de las siguientes propiedades (con relación al mismo anticuerpo o proteína de fusión Fc con N-glicanos del tipo complejo ("tipo salvaje")):

- (a) mayor actividad ADCC;
- (b) mayor afinidad de enlace para el Fc γ RIIIa (y ciertos otros receptores Fc γ);
- 45 (c) sustancialmente la misma o mejor especificidad de enlace para el objetivo;
- (d) sustancialmente la misma o mayor afinidad de enlace para el objetivo; y
- (e) sustancialmente la misma o menor afinidad de enlace para el receptor de manosa.

50 **[0069]** La "actividad ADCC" se refiere a la capacidad de un anticuerpo o proteína de fusión Fc para provocar una reacción ADCC. La ADCC es una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas de antígeno que expresan FcRs (por ejemplo células asesinas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo enlazado a la superficie de la célula objetivo y posteriormente causa la lisis de (es decir "la muerte") de la célula objetivo. Las células mediadoras primarias son células asesinas naturales (NK), las células NK expresan sólo el Fc γ RIII, con el Fc γ RIIIA siendo un receptor de activación y el Fc γ RIIIB uno de inhibición; los monocitos expresan el Fc γ RI, el Fc γ RII y el Fc γ RIII (Ravetch y otros (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92). La actividad ADCC puede ser evaluada directamente usando un ensayo in vitro, por ejemplo, un ensayo de liberación de ⁵¹Cr usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células efectoras NK como se describe en los Ejemplos y en Shields y otros (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604, u otro método adecuado. La actividad ADSS puede ser expresada como una concentración de anticuerpos o proteínas de fusión Fc en la que la lisis de las células objetivo es el medio máximo. En consecuencia, en algunas realizaciones, la concentración de un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención, en la que el nivel de lisis es el mismo que el nivel de lisis medio máximo por el control de tipo salvaje, es al menos 2-, 3-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- veces más bajo que la concentración del mismo control del tipo salvaje. Adicionalmente, en algunas realizaciones, como, por ejemplo, TEM mAb A, el anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención puede mostrar una lisis de la célula objetivo más alta del máximo en comparación con el control del tipo salvaje. Por ejemplo, la lisis de la célula objetivo máxima de un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención puede ser un 10%, un 15%, un 20%, un 25%, o más, más alta que la del control del tipo salvaje.

[0070] La afinidad de enlace de un anticuerpo o proteína de fusión Fc a su objetivo así como a los receptores Fc y los receptores de manosa puede ser evaluada usando la resonancia de plasmones de superficie como se describe en los Ejemplos y/o el ELISA como se describe en Shields y otros (2001) J. Biol. Chem., 176:6591-6604 u otro método adecuado. En algunas realizaciones, la constante de enlace K_d de un anticuerpo o proteína de fusión Fc par el FcγRIIIA puede estar por encima de la del control del tipo salvaje en al menos 2-, 5-, 10-, 50- veces, o más alta. La contante de enlace K_d de un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención para su objetivo (por ejemplo, antígeno) puede ser sustancialmente la misma (es decir, $\pm 50\%$) que la del control del tipo salvaje o estar por encima de ella. En algunas realizaciones, la constante de enlace K_d de un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención para los receptores de manosa puede ser sustancialmente la misma (es decir, $\pm 50\%$) que la del control del tipo salvaje o estar por debajo de ella.

[0071] En algunas realizaciones, ciertos parámetros farmacocinéticos de un anticuerpo o una proteína de fusión Fc de la invención son iguales o mejores que los del control del tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la eliminación de la vida media ($t_{1/2}$) y/o el área bajo la curva de concentración (AUC) pueden ser sustancialmente iguales (es decir $\pm 50\%$) que el control del tipo salvaje o por encima de él. Los parámetros farmacocinéticos pueden ser medidos en humanos o usando un modelo animal apropiado (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos) u otros métodos (ver, por ejemplo, Shargel y otros (1995) Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 4ª ed., McGraw-Hill/Appleton).

[0072] La especificidad de enlace de un anticuerpo o proteína de fusión Fc puede ser determinada por, por ejemplo, citometría de flujo como se describe en los Ejemplos, transferencia de Western, u otro método adecuado. En algunas realizaciones, un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención es dirigida contra una proteína objetivo humana (un antígeno humano en el caso de un anticuerpo) expresada en la superficie de una célula objetivo. En algunas realizaciones, puede ser dirigida contra un antígeno soluble. En algunas otras realizaciones, un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención es dirigida contra un objetivo patogénico (por ejemplo, una proteína viral o bacteriana). El anticuerpo o la proteína de fusión Fc pueden ser o específica para un objetivo humano o pueden ser de reacción cruzada con los objetivos correspondientes de otras especies.

[0073] Los N-glicanos del tipo oligomanosa en los anticuerpos y las moléculas de fusión Fc de la invención comprenden uno o más oligosacáridos del tipo oligomanosa seleccionados del grupo consistente de $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, $\text{Man}_7(\text{GlcNAc})_2$, $\text{Man}_6(\text{GlcNAc})_2$, y $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$.

[0074] Por consiguiente, en las realizaciones preferidas, las composiciones de anticuerpo y proteína de fusión Fc de la invención contienen predominantemente $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, con cantidades disminuidas o indetectables de los N-glicanos del tipo oligomanosa $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, $\text{Man}_7(\text{GlcNAc})_2$, $\text{Man}_6(\text{GlcNAc})_2$, y $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$, mientras contienen cantidades menores (por ejemplo, menos del 10% en relación a todos los N-glicanos) o indetectables de los N-glicanos de tipo complejo (como, G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F, y G0F-Gn).

[0075] En algunas realizaciones, las composiciones producidas por los métodos de la invención o revelados en la misma contienen al menos un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 90%, o más (por la relación molar en relación a todos los N-glicanos) de glicanos del tipo oligomanosa $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$. En algunas realizaciones, los $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ en las composiciones de la invención son sustancialmente no fucosilados, es decir, contienen menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, % (por relación molar, en relación a todos los glicanos) o menos de fucosa. En algunas realizaciones, las composiciones contienen menos del 30%, 20%, 10%, 5%, 1% (por relación molar, en relación a todos los N-glicanos) o menos de los glicanos $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ y/o $\text{Man}_6(\text{GlcNAc})_2$. En algunas realizaciones, las composiciones contienen cantidades menores (es decir, menos de un 10% por relación molar en relación a todos los N-glicanos) o indetectables de $\text{Man}_4(\text{GlcNAc})_2$. En algunas realizaciones, las composiciones contienen menos del 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% (por relación molar, en relación a todos los N-glicanos) o menos de glicanos del tipo complejo.

[0076] La composición del glicano puede ser evaluada usando, por ejemplo, transferencia de lectina, HPLC y/o análisis de espectrometría de masas como se describe en los Ejemplos y/o otros métodos como se describe en, por ejemplo, Towensend y otros (1997) Techniques in Glybiology, CRC Press.

Usos

[0077] También son revelados en la presente métodos para matar una célula objetivo en un mamífero, comprendiendo administrar un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención a un mamífero por lo que el anticuerpo media en la muerte de las células objetivo por el ADCC. La célula objetivo en los métodos de la invención puede ser una célula cancerosa, una célula infectada, una célula de un sistema inmune (por ejemplo una célula B o una célula T), o cualquier otra célula para la que se desee su muerte. El mamífero al que se le administra el anticuerpo o la proteína de fusión Fc puede ser un humano, o de otras especies, como por ejemplo, un roedor.

[0078] Los métodos para matar una célula objetivo incluyen métodos de tratar enfermedades en los que la muerte dirigida por anticuerpos de las células objetivo es deseable, administrando una composición farmacéutica que

comprende un anticuerpo o proteína de fusión Fc de la invención a un mamífero. Además del anticuerpo o la proteína de fusión Fc, las composiciones farmacéuticas comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable. LA formulación de las composiciones farmacéuticas varía dependiendo de la vía pretendida de administración, la actividad biológica del ingrediente activo y de otros parámetros (ver, por ejemplo, por Rowe y otros (2003) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª ed., AphA Publications).

[0079] Los terapéuticos basados en anticuerpos de la invención son ampliamente aplicables a cualquier enfermedad o condición en la que la muerte dirigida por anticuerpos de las células objetivo es deseable. Las enfermedades y condiciones a ser tratadas con las composiciones de la invención incluyen varios tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y mediadas inmunológicamente (incluyendo las enfermedades autoinmunes), enfermedades renales, trasplantes (por ejemplo, trasplante de órganos o células madre), etc.

[0080] Ejemplos de cánceres que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención incluyen, sin limitación, leucemias, linfomas, mielomas y otros cánceres de origen hematopoyético, melanomas y otros cánceres de la piel, y cánceres de riñón, pecho, pulmón, hueso, colon, recto, útero, cérvix, ovarios, páncreas, próstata, testículos, vejiga, estómago, cerebro, y tiroides. Cánceres adicionales incluyen aquellos listados en la Tabla 1 de la Patente U.S. N° 6.359.193.

[0081] Ejemplos de enfermedades infecciosas que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención incluyen las infecciones virales (por ejemplo, RSV, HCV, y virus del Nilo Occidental).

[0082] Ejemplos de enfermedades inflamatorias y mediadas inmunológicamente que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención incluyen la artritis reumatoide (A), la soriasis, el lupus eritematoso sistémico (SLE), y la nefritis lúpica, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM; diabetes tipo I), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), enfermedad celiaca, enfermedad tiroide autoinmune, el síndrome de Sjögren, gastritis autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedades autoinmunes cutáneas, cardiomiopatía dilatada autoinmune, miocarditis, esclerosis múltiple (MS), miastenia gravis (MG), vasculitis (por ejemplo, arteritis de Takayasu y granulomatosis de Wegener), enfermedades autoinmunes del músculo, enfermedades autoinmunes de los testículos, enfermedades ováricas autoinmunes, y uveítis autoinmune.

[0083] Desordenes adicionales que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención incluyen la fibrosis (por ejemplo, fibrosis de riñón), la enfermedad de Addison, corea de Sydenham, colitis ulcerativa, polimialgia, anemia perniciosa; y la anemia perniciosa.

[0084] La "administración" no está limitada a ningún sistema de administración particular y puede incluir la parenteral (incluyendo la inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular, o intraperitoneal), tópica, transdérmica, y oral. La administración puede tener lugar en una única dosis o en administraciones repetidas. Los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc pueden ser administrados en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, al tratar cánceres, los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc pueden ser combinadas con agentes quimioterapéuticos (ver, por ejemplo, La Solicitud de PCT N° de publicación WO 2005/050200), radiación y otros tratamientos (ver, por ejemplo, Schwartz y otros (ed.) Combination Cancer Therapy: Modulators and Potentiators, Humana Press, 2005).

[0085] Con mayor frecuencia, los anticuerpos y las células de fusión Fc son administrados en un entorno ambulatorio por la administración semanal de 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, 1-10 µg/kg, dosis por infusión intravenosa lenta (IV). La dosis efectiva terapéuticamente apropiada, vías y regímenes de administración serán determinados por un médico en base a la actividad biológica del anticuerpo particular en cuestión; las dosis ejemplares para anticuerpos comercializados se pueden encontrar en el 2005 Physicians' Desk Reference (PDR) Thomson Healthcare, 59ª ed., 2004; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds Gennado y otros, 20ª ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000.

[0086] Los siguientes Ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. Los Ejemplos no limitan de ninguna manera la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Tratamiento de células y purificación de anticuerpos

[0087] Se cultivaron las células de hibridoma que expresaban TEM mAb A, un anticuerpo contra el antígeno asociado al tumor vascular, en un medio que contenía un 1% de suero bovino fetal con baja IgG (Invitrogen Corp.), 5 µg/ml de insulina bovina, 5 µg/ml de transferrina humana, 0,01 mM de etanolamina y 25 nM de selenita de sodio. Las células fueron tratadas una vez con los siguientes inhibidores: 20 µg/ml de manoestatina A, y 0,5 mM de NB-DNJ durante 4 días; y dos veces con 2 µg/ml de kifunensina en los días 0 y 2, o cultivadas sin inhibidores ("control").

[0088] Se cultivaron las células de CHO que expresaban TEM mAb B, un anticuerpo diferente contra el antígeno asociado al tumor vascular, en un medio CD-CHO con 4 mM de glutamina. Las células fueron cultivadas durante tres días, mientras se trataron con 2µg/ml de kifunensina en los días 0 y 2 o se cultivaron sin kifunensina ("control"). Los anticuerpos en el medio fueron purificados usando una columna de Proteína A Sepharose™. Tras cargar la columna, la columna fue lavada extensamente con 15 volúmenes de columna de regulador PBS, pH 7,1, o regulador HEPES, pH 8,0, y los anticuerpos fueron eluidos con 50mM de regulador de succinato de sodio, pH 3,0 o pH 3,75. Los eluidos fueron recogidos en tubos a 1 ml por fracción con 1 M de regulador Tris, pH 8,0. Los anticuerpos purificados fueron cambiados de regulador al regulador PBS, pH 7,2, y la concentración de proteína fue determinada usando A280. La pureza de los anticuerpos fue evaluada en un SDS-PAGE al 4-20% y teñida con azul de Coomassie. Se observó una pureza de más del 90% para el TEM mAb A (Figura 2A). Se obtuvieron resultados similares para el TEM mAb B.

Ejemplo 2: Transferencia de Lectina

[0089] Las muestras de anticuerpos purificadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 fueron resueltas en un SDS-PAGE al 4-20% y transferidas a una membrana PVDF. La membrana fue incubada un hora con lectina lenticul biotinilada (una lectina específica para la fucosa α-1,6 enlazada) en 50mM de regulador Tris, pH 7,4, que contenía 0,5 M de NaCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 1% de BSA y 0,5% de Tween 20. Después de eso, la membrana fue lavada e incubada con estreptavidina-HRP en el mismo regulador y después desarrollada usando un reactivo quimioluminiscente.

[0090] Los resultados para el TEM mAb A se muestran en la Figura 2B. Los resultados indican que el anticuerpo de las células tratadas con kifunensina contenían significativamente menos N-glicanos con estructuras fucosiladas α-1,6-enlazadas (se observaron resultados similares para las muestras de TEM mAb B).

[0091] La misma membrana fue despegada usando un regulador de despegue (Pierce), incubada con un anticuerpo Fab-HRP anti humano y desarrollada usando un reactivo quimioluminiscente. Los resultados (Figura 2C) confirmaron igual carga de las muestras de anticuerpo.

Ejemplo 3: análisis de espectro de masas MALDI-TOF de oligosacáridos

[0092] Se liberaron glicanos N-enlazados de los anticuerpos purificados como se ha descrito en el Ejemplo 1 con PNGase F. Tras la filtración a través de filtros de 10 kDa, los filtrados fueron tratados con Dowex AG-50 (H⁺), AG501, y C18 ziptip secuencialmente. Las alícuotas de las muestras fueron aplicadas a un objetivo, seguido de la matriz SDHB. Se adquirió el espectro de masas MALDI-TOF usando una Estación de Trabajo de Bioespectrometría Voyager-DE PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en el modo de ión positivo y reflexivo.

[0093] Los resultados del análisis del TEM mAb A, como se describe en el Ejemplo 1, se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 1.

Tabla 1

Grupos	^a m/z Observado	^a m/z Teórico	Estructuras
Control	1485.9867 (máximo 1)	1485.5344	(HexNAc) ₂ (Desoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0F
1648.1070	1648.1070 (máximo 2)	1647.5874	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Hesoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G1F
Tratamiento de Manoestatina	1486.0117 (máximo 1)	1485.5344	(HexNAc) ₂ (Desoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0F
	1648.1381 (máximo 2)	1647.5874	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Desoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G1 F
Tratamiento de Kifunensina	1743.9953 (máximo 1)	1743.5814	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1906.1454 (máximo 2)	1905.6344	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
Tratamientos de NB- DNJ	1485.9195 (máximo 1)	1485.5344	(HexNAc) ₂ (Desoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0F
	1648.0156 (máximo 2)	1647.5874	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Desoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G1F
	2068.2641 (máximo 3)	2067.6874	(Hex) ₇ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ conteniendo una glucosa sin fucosa

^a los valores de m/z son para los iones [M + Na]⁺.

[0094] Los datos indican que los anticuerpos TEM de las células tratadas con kifunensina contenían principalmente $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Man9), $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Man8) y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Man7) sin fucosa como N-glicanos principales (Figura 3C y 3F) mientras que los N-glicanos principales en los mismos anticuerpos de las células de control eran especies biantenaricos fucosiladas con 0 ó 1 galactosa, incluyendo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_1$ (GOF y $\text{Gal}_1\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_1$ (G1F) (figura 3A y 3E). Los carbohidratos en el TEM mAb A de las células tratadas con manoestatina A fueron similares a los encontrados en el anticuerpo de control (Figura 3B). Sin embargo, hubo cantidades significativas de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Man9Glc) en el TEM mAb A de las células tratadas con NB-DNJ (Figura 3D). Los datos indican que la kifunensina es más efectiva para bloquear la glicosilación de las estructuras del tipo complejo que el NB-DNJ. No tuvo lugar ninguna alteración en la glicosilación en el anticuerpo expresado en las células tratadas con manoestatina A.

Ejemplo 4: Análisis HPLC de N-glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico

[0095] El análisis fue realizado como se describe en Anumula y otros (1998) Glycobiology, 8:685-694, con modificaciones menores. Los N-glicanos liberados de 200 µg de anticuerpos fueron purificados por Biodializador durante la noche. La mitad del material fue etiquetado con ácido 2-aminobenzoico y limpiado con el cartucho GlycoClean S (Prozyme). Varios estándares de N-glicanos fueron también etiquetados con ácido 2-aminobenzoico. Los glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico fueron separados en una columna Asahipak NH2P-50 4D (4,6 X 250 mm, Phenomenex) usando un sistema HP1100 equipado con un detector de fluorescencia (ex. a 230 nm y em. a 425 nm). La columna fue equilibrada en un 50% de solvente A (2% de ácido acético y 1% de tetrahidrofurano inhibido en acetonitrilo). Los glicanos etiquetados con ácido 2-aminobenzoico fueron eluidos a 50° C usando un gradiente lineal de 30-50% de solvente B (5% de ácido acético, 3% de trietilamina, y 1% de tetrahidrofurano inhibido en agua) durante 60 minutos a un caudal de 1ml/min. Los lavados posteriores con 95 % de solvente B y 30% de solvente B se usaron para limpiar y reequilibrar la columna. La cantidad de inyección final igualo a un conjunto de glicanos liberados de 20 µg de anticuerpos.

[0096] Los resultados del análisis HPLC de N-glicanos etiquetados por fluorescencia confirmaron los resultados del análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (Ejemplo 3). Para el control TEM mAb B, el primer máximo en el HPLC se alineó con el estándar GOF (Figura 4A). Los otros dos máximos restantes se presume que son el G1F y el G2F. En el espectro del TEM mAb B de células tratadas con kifunensina, el último y principal máximo MALDI se alineó con el estándar Man9. Sin embargo, los máximos Man7 y Man8 presumidos del anticuerpo no se alinearon son los estándares Man7 y Man8. La diferencia en el tiempo de elución entre los estándares Man7 y Man8 y los máximos de la muestra puede ser atribuida a unas composiciones del isómero diferentes de esas estructuras. La digestión endo H de los N-glicanos etiquetados por fluorescencia del TEM mAb B de las células tratadas con kifunensina resultó en la desaparición de los máximos de Man9, Man8, y Man7, confirmando su identidad estructural de oligomanosa (Figura 4B).

Ejemplo 5: Ensayos de DAC

[0097] Las muestras de anticuerpos de células tratadas con diferentes inhibidores fueron analizadas para ADCC como sigue. Las células objetivo, líneas de células de cáncer de pecho incluyendo SKOV3 o MDA231 con antígenos TEM, fueron resuspendidas en un medio de cultivo y etiquetadas con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ en un incubador a 37° C con un 5% de CO_2 durante 1-2 horas. Las células fueron después lavadas, resuspendidas en el medio RPMI y mezcladas con varias concentraciones de anticuerpos y células efectoras a una tasa efector: objetivo de 100:1 ó 200:1. Las células efectoras eran células mononucleares de sangre periférica (PBMC) preparadas usando una centrifugación por gradiente Ficoll-Hypaque. Las células y los anticuerpos fueron incubados durante 4-18 horas a 37° C en una incubadora humidificada con un 5% de CO_2 . Tras la incubación, las células intactas fueron retiradas por centrifugación o lisadas usando detergente. La radioactividad en los sobrenadantes de la liberación experimental (E), la liberación espontanea (S, liberación del objetivo sin células efectoras y anticuerpos), y el lisado total (T, liberación de las células objetivo tratadas con detergente) se determinó usando un contador de radiación. El porcentaje específico de lisis se calculó como sigue: $[(E-S)/(T-S)] \cdot 100$.

[0098] Los resultados de los ensayos de ADCC de los anticuerpos TEM mAb A de las células de hibridoma expresados en la presencia de varios inhibidores se muestran en la Figura 5A. Los datos muestran que el TEM mAb de las células de hibridoma tratadas con kifunensina (inhibidor #2) tenían la actividad ADCC más alta entre las muestras de anticuerpo. Los anticuerpos de las células tratadas con NB-DNJ (inhibidor #3) mostraron una actividad ADCC más baja que los mismos anticuerpos de las células tratadas con kifunensina, pero una mayor actividad en comparación con el resto de las muestras. La actividad ADCC del TEM mAb A de las células tratadas con manoestatina A (inhibidor #1), fue comparable al de las muestras de control. Los resultados indicaron que la actividad ADCC se correlaciona con los patrones de glicosilación de los anticuerpos.

[0099] Un ensayo ADCC similar fue realizado con el TEM mAb A producido por células tratadas con kifunensina (inhibidor #2) así como con células de control no tratadas. Los resultados (Figura 5B) mostraron un incremento de 10-100 veces en la actividad ADCC para el anticuerpo de las células tratadas con kifunensina en comparación con las células de hibridoma tratadas sin inhibidor (control). Otro ensayo ADCC similar fue también realizado en el TEM mAb B de las células de CHO tratadas con kifunensina y los controles no tratados. Los resultados (Figura 5C)

mostraron que el TEM mAb B de las células tratadas con kifunensina produjeron anticuerpos con una actividad ADCC mayor que la de los controles.

Ejemplo 6: Análisis de Citometría de Flujo

[0100] Se realizó un ensayo FACS® para determinar el enlace del TEM mAb A y el TEM mAb B a los antígenos en las células objetivo. Se incubaron 2×10^5 células objetivo con anticuerpo de células tratadas con varios inhibidores como se describe en el Ejemplo 5. La solución de incubación contenía de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo en PBS con un 5% de suero bovino fetal y un 5% de suero de cabra. El anticuerpo enlazado fue detectado con un Fc antihumano de cabra FITC-etiquetado y analizado usando un FACS Calibur (Becton Dickinson).

[0101] Los resultados del análisis FACS® indican que a pesar de la diferencia en las actividades ADCC (ver Ejemplo 5), el TEM mAb A (Figura 6A) y el TEM mAb B (Figura 6B) enlazan igualmente bien con los antígenos de la superficie celular sin tener en cuenta si fueron producidos con o sin kifunensina.

Ejemplo 7: enlace del receptor Fc y del receptor de manosa

[0102] Como la actividad ADCC está correlacionada con el enlace del anticuerpo o el complejo anticuerpo-antígeno a los receptores Fc, especialmente el Fc γ RIIIA, se investigó la interacción de los anticuerpos con el Fc γ RIIIA usando la resonancia de plasmones de superficie. El TEM mAb B fue inmovilizado en un chip CM5 con un antígeno TEM. El Fc γ RIIIA humano recombinante soluble (Val158) fue después inyectado en una unidad de biosensor BIAcore™ 3000 para monitorizar el enlace.

[0103] Los resultados (Figura 7) indicaron un mayor enlace del Fc γ RIIIA al TEM mAb B expresado en la presencia de kifunensina en comparación con el mismo anticuerpo expresado en la ausencia del inhibidor. El enlace aumentado del anticuerpo de las células tratadas con kifunensina al receptor Rc se correlaciona con la mejora de la actividad ADCC de estos anticuerpos.

[0104] Se sabe que la depuración in vivo a través del receptor de manosa es bastante rápida. Por lo tanto, el enlace del TEM mAb B al receptor de manosa se investigó usando la resonancia de plasmones de superficie (BIAcore™). Un receptor de manosa soluble que contenía el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) 4-7 y una etiqueta HPC fue inmovilizada a una superficie de CM5 BIAcore (200 RU). Los anticuerpos fueron diluidos a 100nM en un regulador de enlace HBS (10 mM de HEPES, pH 7,0, 150 mM de NaCl) que contenía 10 mM de CaCl_2 y un 0,005% de surfactante P20 e inyectados en una unidad de biosensor BIAcore™ 3000 para monitorizar el enlace. La glucocerebrosidasa manosa terminada (100 nM) fue incluida como un control positivo.

[0105] Los resultados de los experimentos del enlace del receptor de manosa (Figura 8) mostraron que el enlace del anticuerpo de las células tratadas con kifunensina o las no tratadas con kifunensina fue más bajo que el del control (proteína con N-glicanos del tipo oligomanosa como el $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ ("Glicoproteína Man3"). Estos resultados sugieren, que cuando se administran in vivo, los anticuerpos que transportan glicanos del tipo oligomanosa no es probable que sean rápidamente depurados por el receptor de manosa.

Ejemplo 7: Análisis de afinidad de anticuerpos

[0106] La afinidad de enlace del TEM mAb B expresado en la presencia de kifunensina se comparó con la del anticuerpo expresado en ausencia del inhibidor usando la resonancia de plasmones de superficie (BIAcore™) como sigue. La afinidad del anticuerpo se midió usando chips CM5 transportando el antígeno inmovilizado. Los anticuerpos diluidos en diferentes concentraciones usando HBS-EP o PBS conteniendo un 0,005% de surfactante P20 llevando regulador fueron inyectados por duplicado o por triplicado durante 5 minutos, seguidos por una disociación de 5 minutos. Se usaron 40 mM de HCl para regenerar la superficie. Un modelo de enlace 1:1 fue después usado para ajustar los datos.

[0107] Los resultados (Tabla 2) mostraron afinidades comparables del TEM mAb B expresados en la presencia o en la ausencia de kifunensina, cuando se usó un modelo de enlace 1:1 para ajustar los datos. Los sensorgramas mostraron casi idénticas curvas de enlace para ambas muestras a cada concentración probada. Estos resultados fueron consistentes con los datos del enlace del anticuerpo con el antígeno en las células objetivo usando FACS (Ejemplo 6).

Tabla 2

TEM-1 mAb B (CHO)	k_a^a (1/Ms x 10 ⁶)	k_d^b (1/s x 10 ⁻³)	K_A^c (1/M x 10 ⁹)	K_D^d (M x 10 ⁻⁹)
Sin tratar	1,16	1,14	1,01	0,99
Tratado con kifunensina	1,44	1,18	1,22	0,82

^a tasa on; ^b tasa off; ^c tasa de asociación; ^d tasa de disociación

Ejemplo 9: Análisis farmacocinético

[0108] Se realizó un análisis farmacocinético usando ratones inyectados con TEM mAb B expresado en la presencia o ausencia de kifunensina. El TEM mAb B se inyectó en ratones BALB/c por la vena de la cola a 5 mg/kg. Había 10 ratones por grupo. La sangre se recogió al de 1, 6 horas y 1, 2 y 7 días tras la inyección y se mantuvo congelada. La cantidad de TEM mAb B en el suero fue medida usando el ELISA con anticuerpos antihumanos.

[0109] Los resultados se presentan en la Figura 9. No hubo una diferencia significativa en la vida media de la eliminación aparente de las muestras de TEM mAb B de las células tratadas con o sin kifunensina. Se observó una pequeña diferencia en la cantidad de ambos anticuerpos en el suero de los ratones en el día 7 tras la inyección. Los resultados sugieren que los glicanos del tipo oligomano en el TEM mAb no contribuyeron a una depuración significativa por el receptor de manosa en base a los datos de enlace del receptor de manosa *in vitro* (Ejemplo 7) y a las farmacocinéticas.

Ejemplo 10: Producción del anticuerpo en cultivos en lote

[0110] Se evaluó la producción de TEM mAb B de cultivos en lote tratados con varias cantidades de kifunensina o sin tratar. Las células de CHO en frascos de agitación fueron tratadas con 0, 0,5, 1, 1, 5 ó 2 µg/ml en una única o tres adiciones (4 días aparte) y cultivadas durante 11 días. La viabilidad celular (usando azul de tripano) y los conteos celulares fueron evaluados al menos cada otro día.

[0111] El VPR (Tasa de producción de volumen) de anticuerpo durante los 11 días en cultivo con un único tratamiento de kifunensina a concentraciones de 0,5 a 2 µg/ml fue comparable al de los tratamientos triples en la misma cantidad de inhibidor. Los resultados mostraron una cantidad similar de anticuerpos producidas bajo condiciones diferentes. (Tabla 3). La viabilidad de las células fue comparable para condiciones diferentes (Figura 10A), mientras que la densidad celular fue más baja en las células tratadas con kifunensina. El tratamiento de las células con tres adiciones de kifunensina resultó en una densidad celular mucho más baja que en el control sin tratar o en un único tratamiento de kifunensina (Figura 10B y Tabla 3).

[0112] El efecto de la kifunensina en la producción del TEM mAb A EN cultivos en lote fue probada igualmente. Las células fueron cultivadas en spinners durante 11 días en el medio con 2 µg/ml de kifunensina (una única adición) o sin ella. La viabilidad celular (usando azul de tripano) y los conteos celulares fueron evaluados al menos cada otro día.

Tabla 3

Muestra	VPR (mg/l) ^a	Xvmax ^b (x10 ⁶ células)	SPR (medio) ^c Pg/célula/día
#1, sin tratar	350.6	4.3	14.9
#2, 0,5 µg/ml kif	390.1	3.5	20.0
#3, 1 µg/ml kif	386.9	2.7	26.0
#4, 1,5 µg/ml kif	387.6	3.8	18.6
#5, 2 µg/ml kif	371.8	2.1	31.7
#6, 0,5 µg/ml kif sup. 3x	397.7	3.5	21.0
#7, 1 µg/ml kif sup. 3x	376.1	1.6	43.6
#8, 1,5 µg/ml kif sup. 3x	377.7	1.6	41.9
#9, 2 µg/ml kif sup. 3x	341.0	1.7	36.5

^a tasa de producción de volumen; ^b células viable en el día de densidad celular máxima; ^c tasa de producción específica.

[0113] Los resultados mostraron una viabilidad celular similar y conteos celulares (Figura 12). Se observó alrededor de un 60% de aumento en el título de anticuerpos con la kifunensina en comparación con los controles. Los resultados del análisis de espectro de masas MALDI-TOF también indicaron la presencia de N-glicanos que contenían Man8- y Man9- como especies principales en el TEM mAb de células tratadas con kifunensina (Figura 11K). Los carbohidratos en el TEM mAb B purificado de estos cultivos contenían N-glicanos contenedores de Man9- y Man8- similares independientemente de la cantidad de kifunensina usada (Figura 11 y Tabla 4). Un único tratamiento de kifunensina a una concentración de 0,5 µg/ml fue suficiente para resultar en la producción de estructuras del tipo oligomanosa.

[0114] El tratamiento de kifunensina no afectó a la viabilidad celular o la producción de anticuerpos. El crecimiento celular fue retardado, especialmente en la dosis alta y en múltiples tratamientos de kifunensina, en las células de CHO en frascos de agitación pero no en los cultivos con agitación centrífuga, sugiriendo que el tratamiento de kifunensina podía haber resultado en una expresión de anticuerpos aumentada y/o en la eficiencia de secreción.

Tabla 4

Grupos	m/z Obsevado ^a	m/z Teórico ^a	Estructuras
#1, sin tratar	1486.1199 (máximo 1)	1485.5344	(HexNAc) ₂ (Deoxihesosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0F
	1648.2581 (máximo 2)	1647.5874	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxihesosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G1F
	1282.9616 (máximo 3)	1282.4553	(HexNAc) ₁ (Deoxihexosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0F-Gn
	1340.0094 (máximo 4)	1339.4763	(HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G0
1810.3561	1810.3561 (máximo 5)	1809.6403	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxihesosa) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ G2F
#2, 0.5 µg/ml kif	1906.6223 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.4747 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.3702 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#3, 1 µg/ml kif	1906.4626 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.3398 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.2029 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#4, 1.5 µg/ml kif	1906.7339 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.5612 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.4397 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#5, 2 µg/ml kif	1906.7511 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.5969 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.4309 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#6, 0.5 µg/ml kif sup. 3x	1906.8270 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.6267 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
1582.5494	1582.5494 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#7, 1 µg/ml kif sup. 3x	1906.6577 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.5094 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.4178 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#8, 1.5 µg/ml kif sup. 3x	1906.5720 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1744.4355 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1582.3379 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
#9, 2 µg/ml kif sup. 3x	1905.8527 (máximo 1)	1905.6343	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₉ sin fucosa
	1743.7679 (máximo 2)	1743.5813	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₈ sin fucosa
	1581.7125 (máximo 3)	1581.5283	(Hex) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Man ₇ sin fucosa
^a los valores de m/z son para los iones [M +Na] ⁺			

Ejemplo 11: Ejemplo adicional de actividad ADCC mejorada y enlace de FcγRIIA más alto para un anticuerpo producido en células tratadas con kifunensina

[0115] Se produjo un anticuerpo contra el antígeno del carcinoma de pulmón de células pequeñas (anticuerpo C) en células tratadas con o sin kifunensina. El ADNc para el anticuerpo fue transitoriamente transferido a células HEK293. En el día 2, el medio fue retirado y se añadió un medio fresco con 2 µg/ml de kifunensina o sin kifunensina en unos frascos de 3 capas T-150. El medio fue recogido tras el tratamiento de las células con kifunensina durante 3 días. El anticuerpo fue purificado de los 150~200 ml de medio. La pureza de los anticuerpos fue analizada usando un SDS-PAGE gradiente al 4-20%, mientras la glicosilación fue investigada usando una transferencia de lectina. Los resultados del análisis SDS-PAGE indicaron una alta pureza de las muestras de anticuerpo. Había presente mucha menos fucosa α-1,6-enlazada en los anticuerpos expresados en la presencia de kifunensina. El análisis MS MALDI-TOF mostró la modificación completa de los glicanos en Man9 y Man8 sin fucosa en el anticuerpo C expresado en la presencia de kifunensina.

[0116] La actividad ADCC de las dos muestras fue medida usando células expresando endógenamente el antígeno del tumor como células objetivo. El ensayo fue realizado incubando células efectoras (PBMC humano) y células objetivo durante 5 horas a una tasa de 50:1 ó 100:1. Los resultados, que se muestran en las Figuras 13A y 13B, respectivamente, indican una mejora significativa en la actividad ADCC del anticuerpo C expresado en la presencia de kifunensina a bajas concentraciones de anticuerpo.

[0117] El enlace del FcγRIIA del anticuerpo C tratado con kifunensina se midió usando BIAcore. El FcγRIIA humano soluble etiquetado HPC-4 se diluyó a 30 µg/ml en regulador HBS-P, conteniendo un 1mM de CaCl₂ y se inyectó en un chip Anti-HPC4 14.500 RU durante 3 minutos a 5µl/minuto. Todos los anticuerpos fueron diluidos a 100nM en el mismo regulador y fueron inyectados tras la captura del FcγRIIA soluble durante 1 minuto, seguido por 3 minutos de disociación a 30 µl/minuto. La superficie fue regenerada con 2 pulsos de 5mM de EDTA en regulador HBS-P. Los resultados del análisis BIAcore® mostraron un enlace del FcγRIIA más alto del anticuerpo expresado en la presencia de kifunensina en comparación con el anticuerpo de control (Figura 14). Los resultados son consistentes con lo observado en la mejora del ADCC. Los anticuerpos modificados tienen tasas off más lentas (ver Figura 14).

Ejemplo 12: Ajuste de la concentración de kifunensina

[0118] Para investigar el impacto de los glicanos del tipo complejo y de oligomanosa mezclados en la función anticuerpo, las células que expresan el TEM mAb A fueron tratadas con varias cantidades de kifunensina. En el primer experimento, un clon de célula de CHO que expresa el TEM mAb A se trató con 0, 4, 20, 100, 500 y 2500 ng/ml de kifunensina durante 11 días. El medio fue recogido, y el anticuerpo fue purificado usando una columna de proteína A. Las fracciones que contenían los máximos de proteínas fueron reunidas y dializadas en PBS.

[0119] La pureza de las seis muestras de anticuerpo fue confirmada usando un SDS-PAGE gradiente al 4-20% bajo condiciones de reducción, seguido por el tñido con azul de Coomassie. Los resultados confirmaron que estos anticuerpos eran puros.

[0120] El análisis MS MALDI-TOF fue realizado en estas seis muestras (mostrado en las Figuras 15^a-15F). Los resultados mostraron solo una pequeña cantidad de estructuras de oligomanosa (man5/Man6) en el anticuerpo de las células tratadas con 20 ng/ml de kifunensina, mientras que 100 ng/ml de kifunensina resultó en estructuras de oligomanosa completas.

[0121] Un segundo experimento de ajuste se realizó con un rango más estrecho de concentración de kifunensina, específicamente, de 20 a 100 ng/ml. Tras el tratamiento durante 11 días, se recogieron 50 ml de medio de cada condición de tratamiento, y se purificó el anticuerpo. Se reunieron las fracciones que contenían los máximos, se intercambiaron los reguladores en el PBS usando filtros Centricon® con centrifugación repetida. Las alícuotas de las muestras de anticuerpo del TEM mAb A fueron aplicadas a un NuPAGE al 4-12% y tñidas con azul de Coomassie para confirmar la pureza.

[0122] Los resultados de la MS MALDI-TOF realizados en estas muestras se muestran en las Figuras 16^a-16E. Las estructuras glicanas de los anticuerpos de las células tratadas con 20 y 100 ng/ml de kifunensina fueron similares a las encontradas en el primer experimento de ajuste, mientras que el tratamiento de kifunensina a concentraciones de 40 y 60 ng/ml resultó en anticuerpos con glicanos de oligomanosa y de tipo complejo mezclados.

[0123] Además, se realizó un ensayo ADCC. Los resultados mostraron una mayor actividad ADCC para anticuerpos de células tratadas con 2500 ng/ml de kifunensina en comparación con los anticuerpos producidos sin ningún inhibidor en el primer experimento de ajuste (Figura 17A). Cuando las cinco muestras del segundo experimento de ajuste se compararon, los anticuerpos expresados en presencia de 60, 80 y 100 ng/ml de kifunensina mostraron mayor actividad ADCC que los anticuerpos de las células tratadas con 20 y 40 ng/ml de kifunensina. Ver Figura 17B.

[0124] La cantidad de glicanos fucosilados y no fucosilados en los anticuerpos de cada tratamiento de kifunensina en el segundo experimento de ajuste se estimó calculando el área de cada máximo de glicano individual en el espectro MS MALDI-TOF. El porcentaje de glicanos no fucosilados fue medido contra el porcentaje de lisis de las células objetivo específicas y se muestra en la Figura 18. Los resultados sugieren que el TEM mAB A con más del 80% de glicanos no fucosilados tienen una actividad ADCC relativamente más alta.

[0125] En resumen, los anticuerpos de las células tratadas con ≥ 80 ng/ml de kifunensina mostraron sólo estructuras de oligomanosa son ninguna fucosa. Cuando la concentración de kifunensina se bajo a 60 ng/ml, y después adicionalmente a 20 ng/ml, los anticuerpos mostraron cantidades crecientes de glicanso del tipo complejo con fucosa. La actividad ADCC más alta se consiguió con 60 ng/ml o más alta de concentraciones de kifunensina lo que, a su vez, produjo más de un 80% de glicanos no fucosilados.

Ejemplo 13: Enlace de receptores Fc humanos con anticuerpos de células tratadas con kifunensina

[0126] El enlace del anticuerpo D modificado con kifunensina, otro anticuerpo anti tumor, con varios receptores Fcy humanos recombinantes (Fc γ RI, Fc γ RIIA, y Fc γ RIIB) se analizó usando un ensayo de enlace de formato ELISA. Se recubrieron placas de microtítulo de 96 pocillos con receptores Fcy del sistema de I+D a las siguientes concentraciones: 0,6 μ g/ml de Fc γ RI, 2,5 μ g/ml de Fc γ RIIA, y 2 μ g/ml de Fc γ RIIB. Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS que contenía un 0,1% de Tween 20 y después se bloquearon con PSB/1% durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos, incluyendo el anticuerpo D de las células tratadas con o sin kifunensina variando de 0 a 100 μ g/ml, se añadieron a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las concentraciones de anticuerpos comenzaron a 100 μ g/ml y se usó una dilución de serial 1:2. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS que contenía un 0,1% de Tween 20. El anticuerpo enlazado fue detectado usando una incubación de 1 hora con un Fab-HRP antihumano de cabra (1:1500) en PBS que contenía un 1% de BSA a temperatura ambiente. Las placas fueron después lavadas y desarrolladas con TMB (BioFX lab) a 15 minutos para el Fc γ RI y el Fc γ RIIB y a 30 minutos para el Fc γ RIIA. La reacción se paró con 2M de H₂SO₄ y la absorbancia leída a 450 nm. El anticuerpo D de las células tratadas con o sin kifunensina enlazó fuertemente con el Fc γ RI de alta afinidad en comparación con los receptores de afinidad baja, Fc γ RIIA y Fc γ RIIB. Los resultados, presentados en las Figuras 19A-19C, sugerían que el tratamiento de kifunensina puede mejorar el enlace del anticuerpo con el Fc γ RIIA y el Fc γ RIIB pero no con el Fc γ RI.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0127]

<110> Genzyme Corporation
Edmunds, Tim
Zhou, Qun
McPherson, John

<120> Terapéuticos basados en anticuerpos con actividad ADCC mejorada

<130> 7860.51-304

<150> 60/728,947

<151> 2005-10-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> humano

<220>

<221> CARACTERISTICA MISC.

<222> (127)..(127)

<223> D o E

<220>

<221> CARACTERISTICA MISC.

<222> (129)..(129)

<223> L o M

<400> 1

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu
115 120 125
Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 2

<211> 217

<212> PRT

<213> Humano

<400> 2

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 val val Asp val Ser His Glu Asp Pro Glu val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 val Asp Gly val Glu val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg val val Ser val Leu Thr val val His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 3
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> humano

<400> 4

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir un anticuerpo monoclonal glicosilado o proteína de fusión Fc que tiene al menos un 70% de N-glicanos $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$, y un 10% o menos de N-glicanos complejos, por proporción molar, en relación a todos los N-glicanos, que comprende:
 - (a) proporcionar un anticuerpo monoclonal que produce una célula mamífera o una proteína de fusión Fc que produce una célula mamífera;
 - 10 (b) cultivar la célula en presencia de kifunensina; y
 - (c) recuperar el anticuerpo glicosilado o proteína de fusión Fc.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la kifunensina se usa a una concentración de 0,01 a 100 $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo de al menos 12 horas.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la kifunensina se usa a una concentración de 0,01 a 50 $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo de al menos 12 horas.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde la kifunensina se usa a una concentración de 0,01 a 20 $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo de al menos 12 horas.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la kifunensina se usa a una concentración de 0,01 a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo de al menos 12 horas.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde las células de ovario de hámster chino CHO o de hibridoma se incuban con 0,5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de kifunensina durante 10 días.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc tiene al menos un 90% de N-glicanos $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc tiene menos de un 30% de N-glicanos $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ y/o $\text{Man}_6(\text{GlcNAc})_2$ por proporción molar, en relación a todos los N-glicanos.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc tiene menos de un 30% de N-glicanos fucosilados por proporción molar, en relación a todos los N-glicanos.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las células son células de ovario de hámster chino CHO, células de hibridoma de ratón, células de mieloma, células de riñón embrionarias humanas, células de riñón de mono, células de carcinoma epitelial humanas, células de fibrosarcoma humanas, o células de riñón de hámster bebé.
11. El método de la reivindicación 10, en donde las células son células de CHO.

45

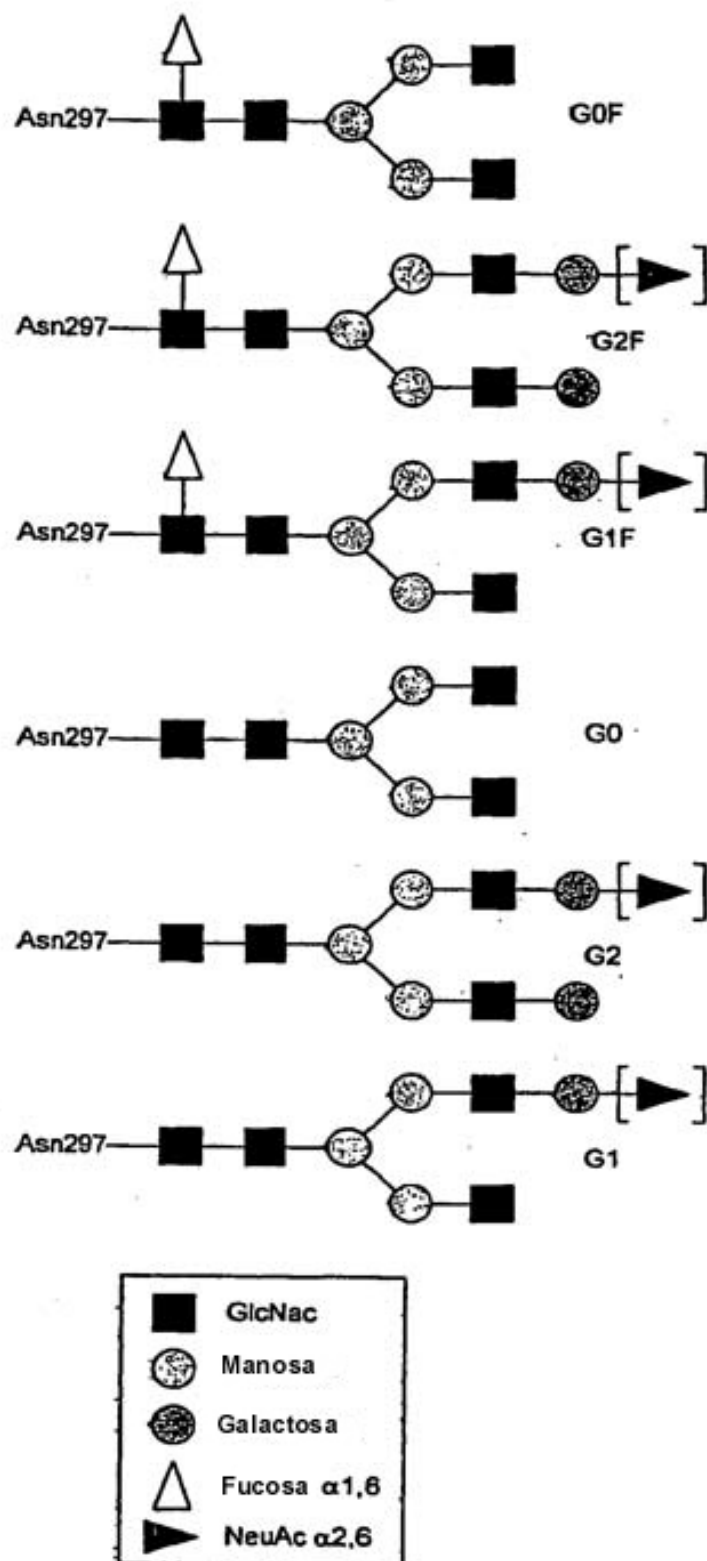


FIG. 1A

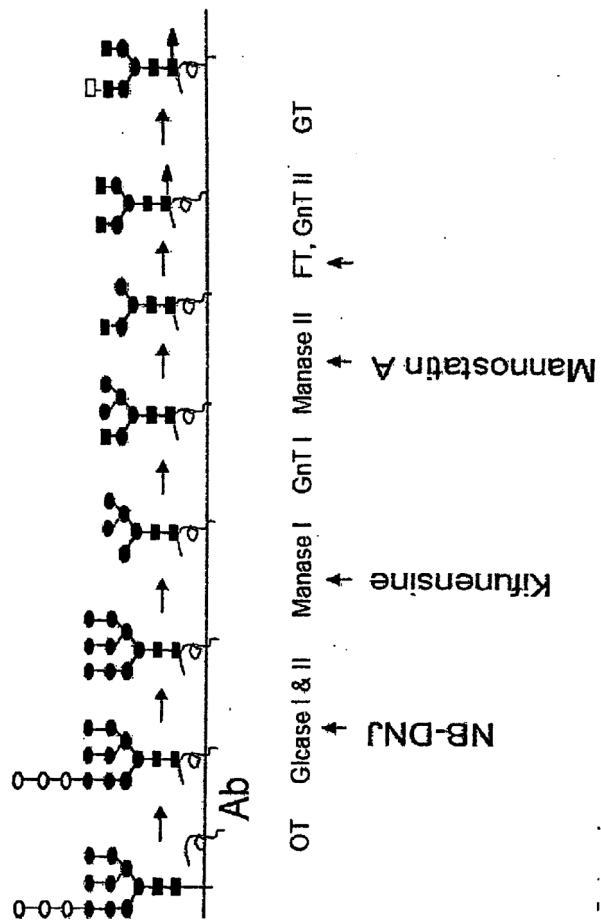


FIG. 1B

	230	240	250	260	270
hIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
hIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
hIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
hIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV				
	****			*	* *
	280	280	300	310	320
hIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
hIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
hIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
hIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
	330	340	350	360	370
hIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
hIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
hIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
hIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
hIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
hIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
hIgG3	EWESSGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCFSVMH				
hIgG4	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMH				
	*	*	*	*	* *
	430	440			
hIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
hIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
hIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
hIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
	**		*		

FIG. 1C

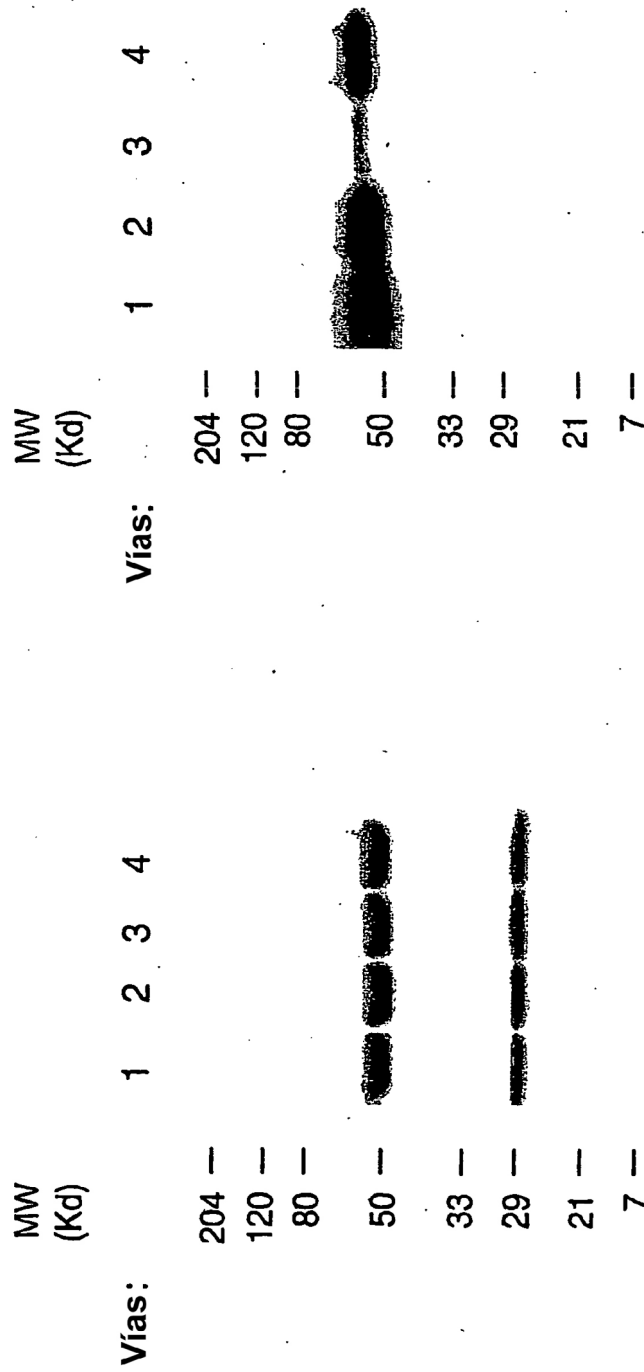


FIG. 2A

FIG. 2B

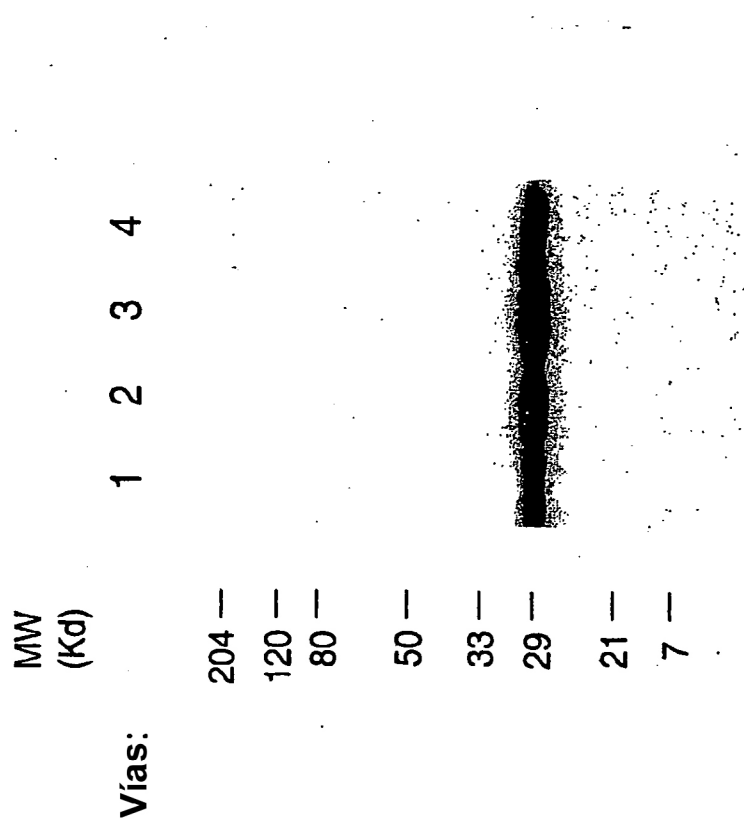


FIG. 2C

FIG. 3A

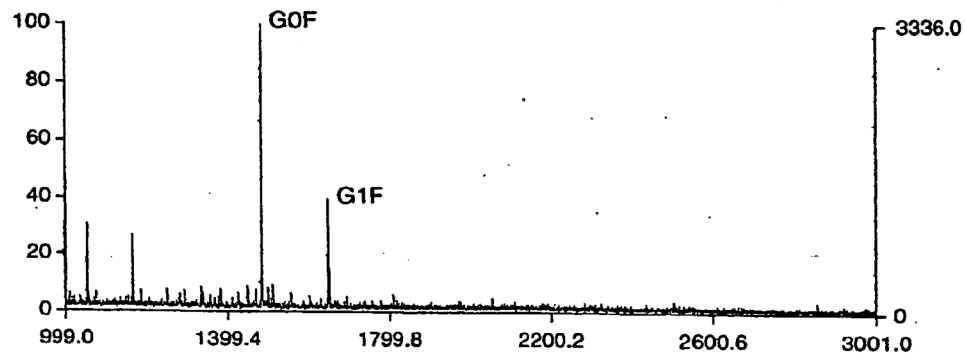


FIG. 3B

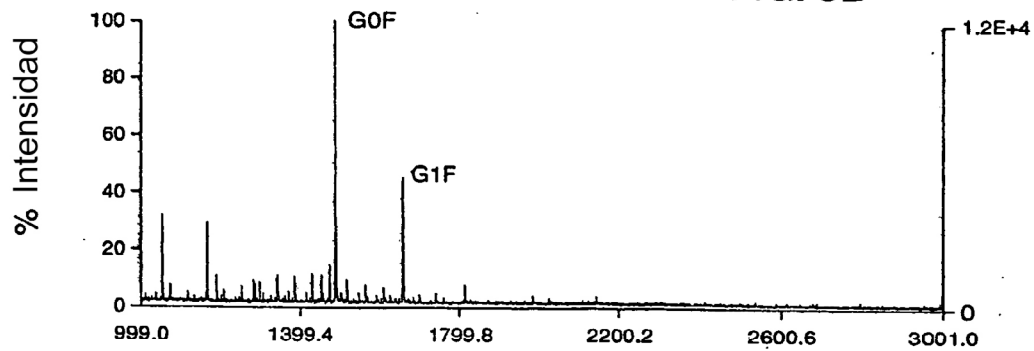


FIG. 3C

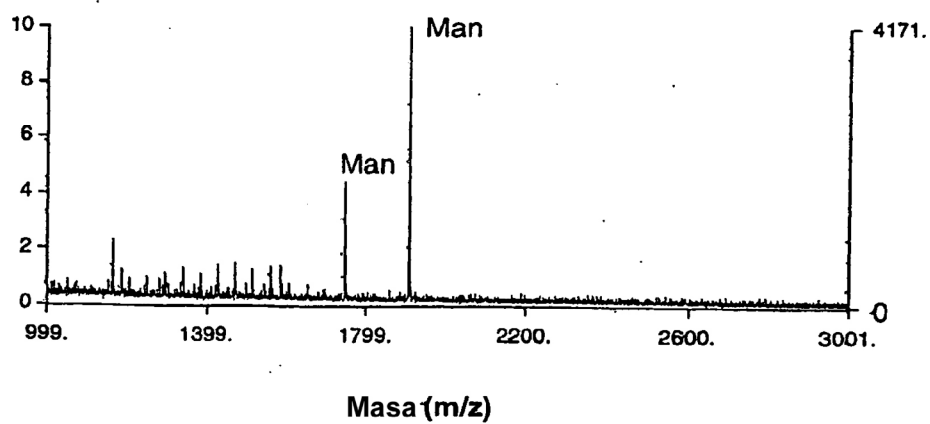


FIG. 3D

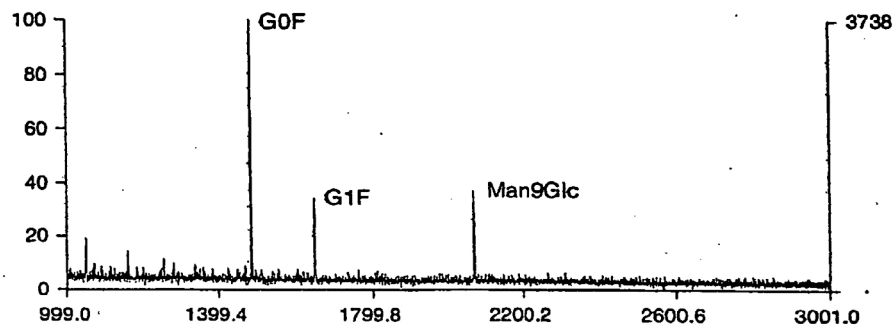


FIG. 3E

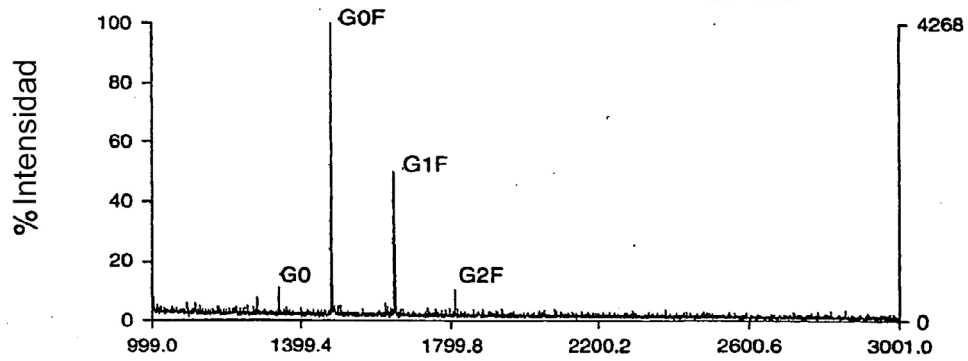
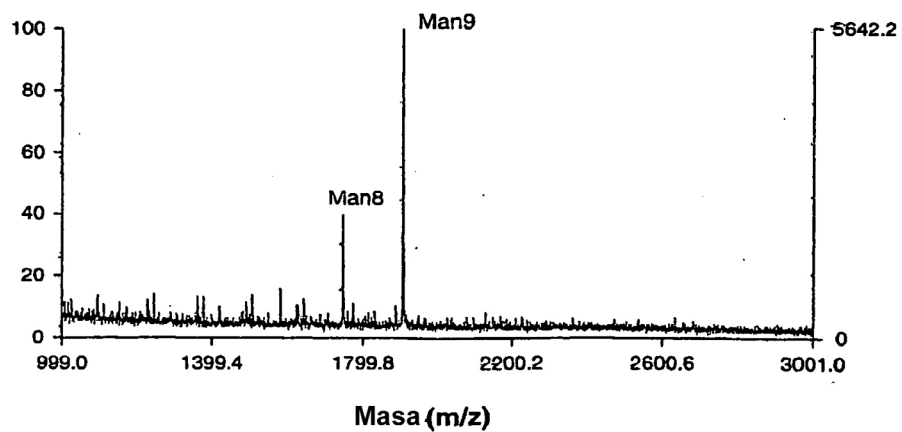


FIG. 3F



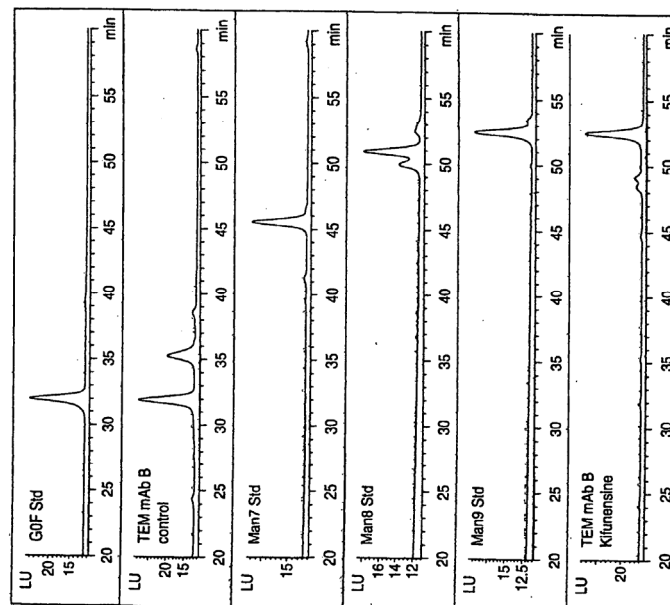


FIG. 4A

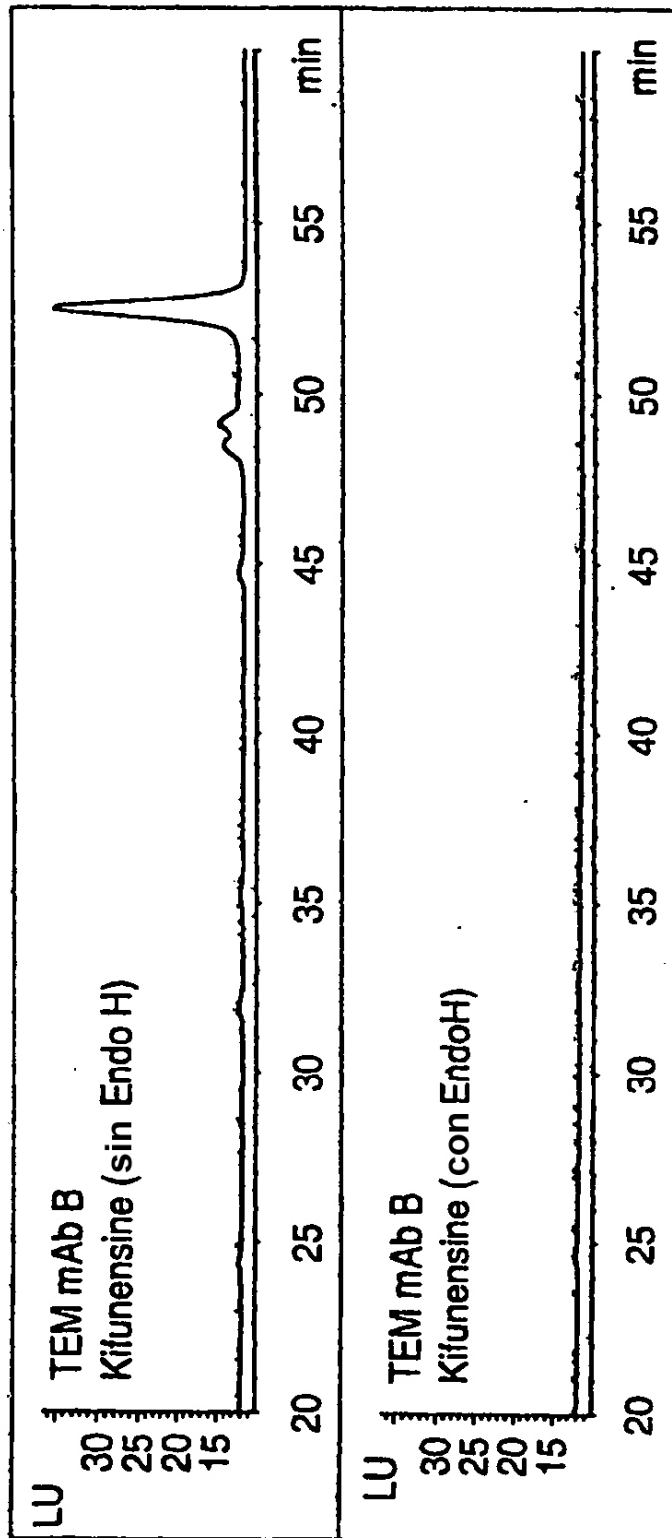


FIG. 4B

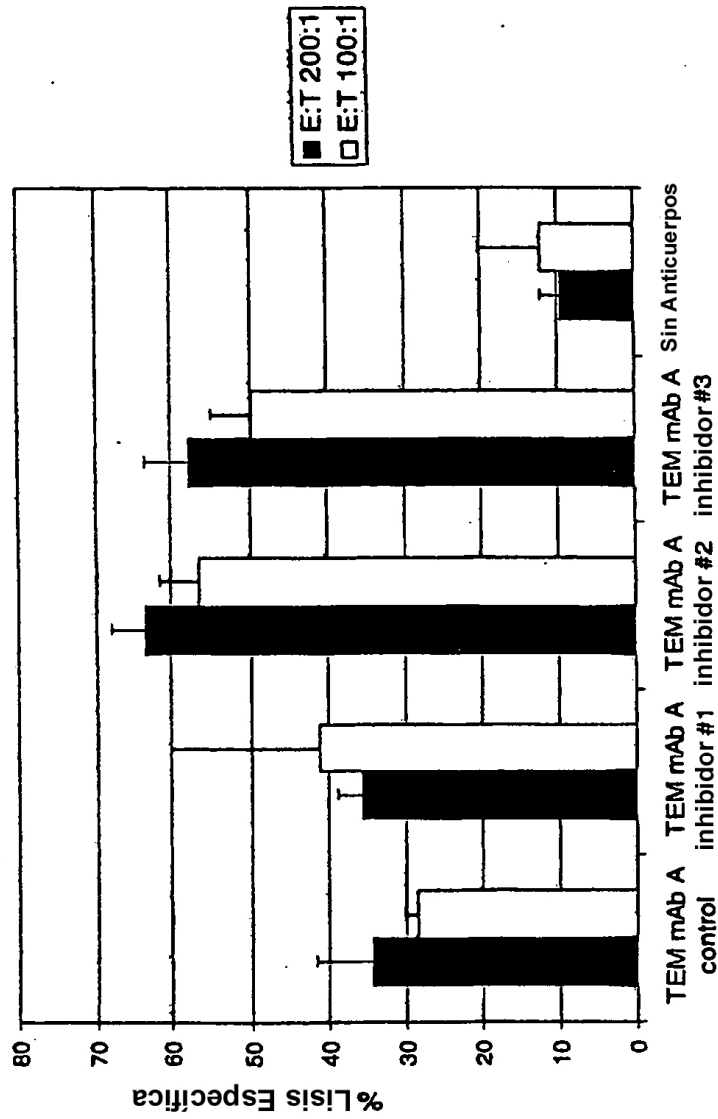


FIG. 5A

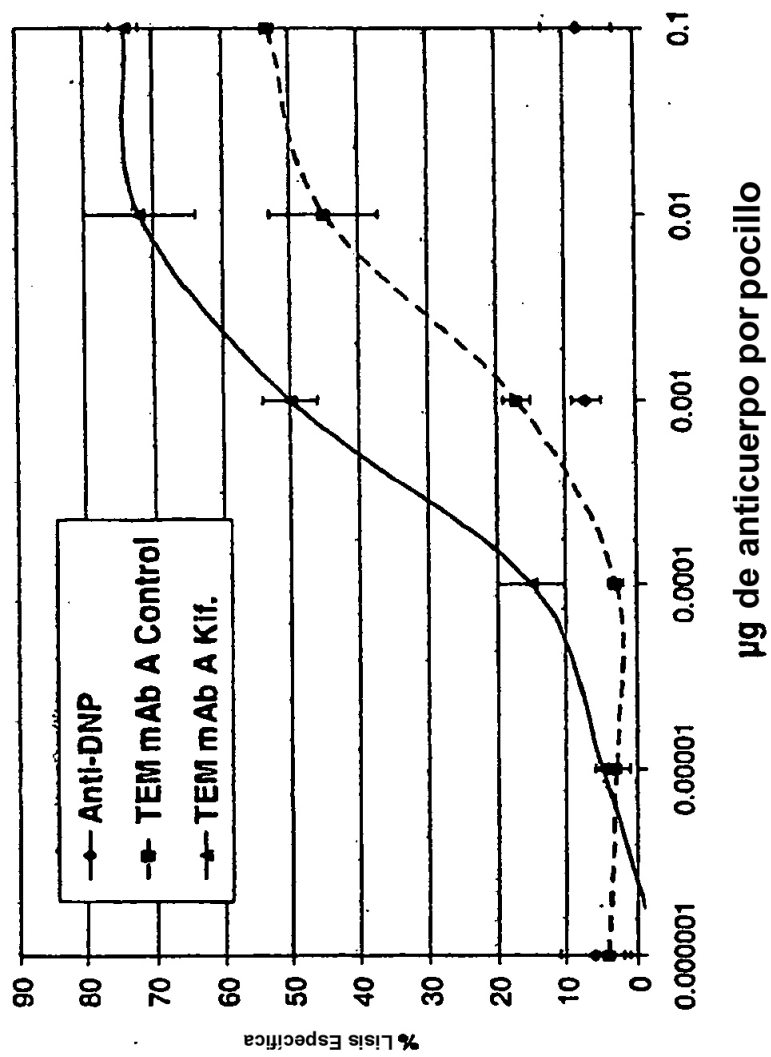


FIG. 5B

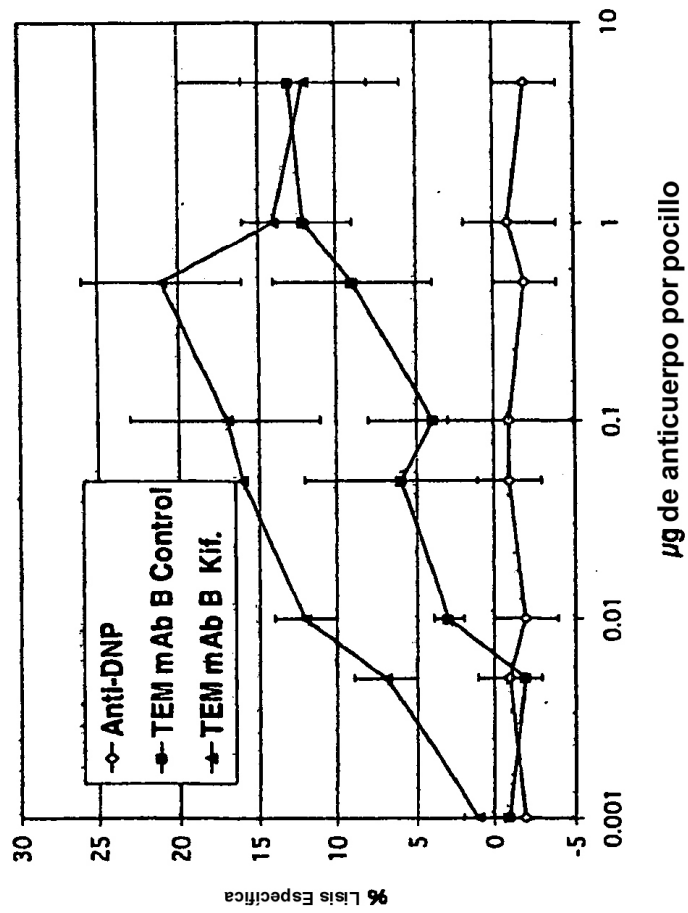


FIG. 5C

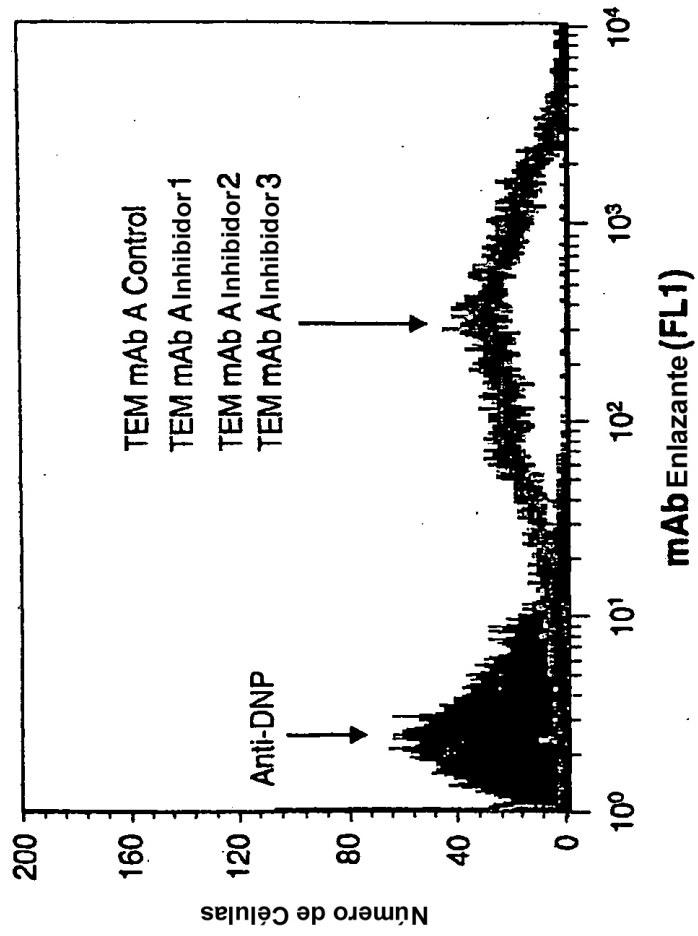


FIG. 6A

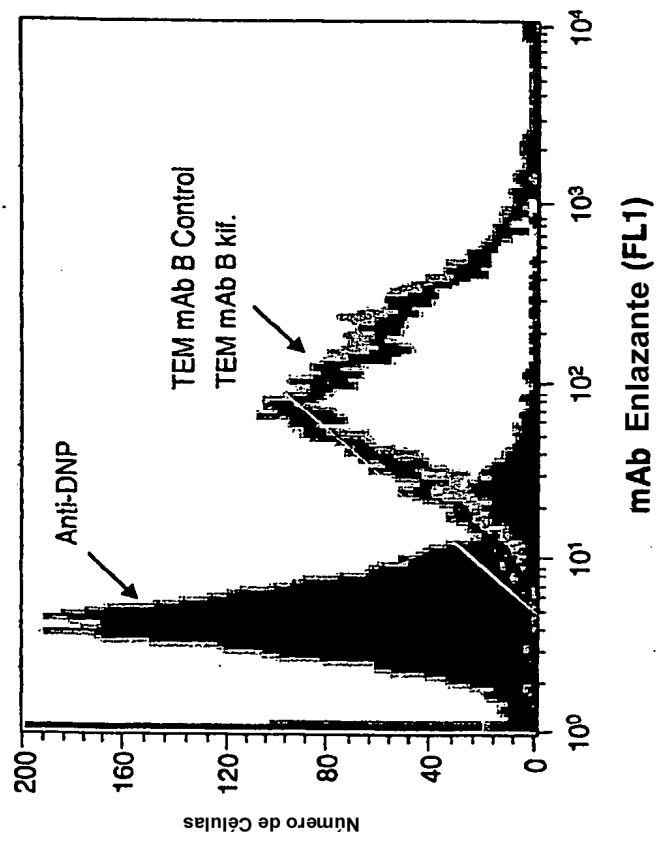


FIG. 6B

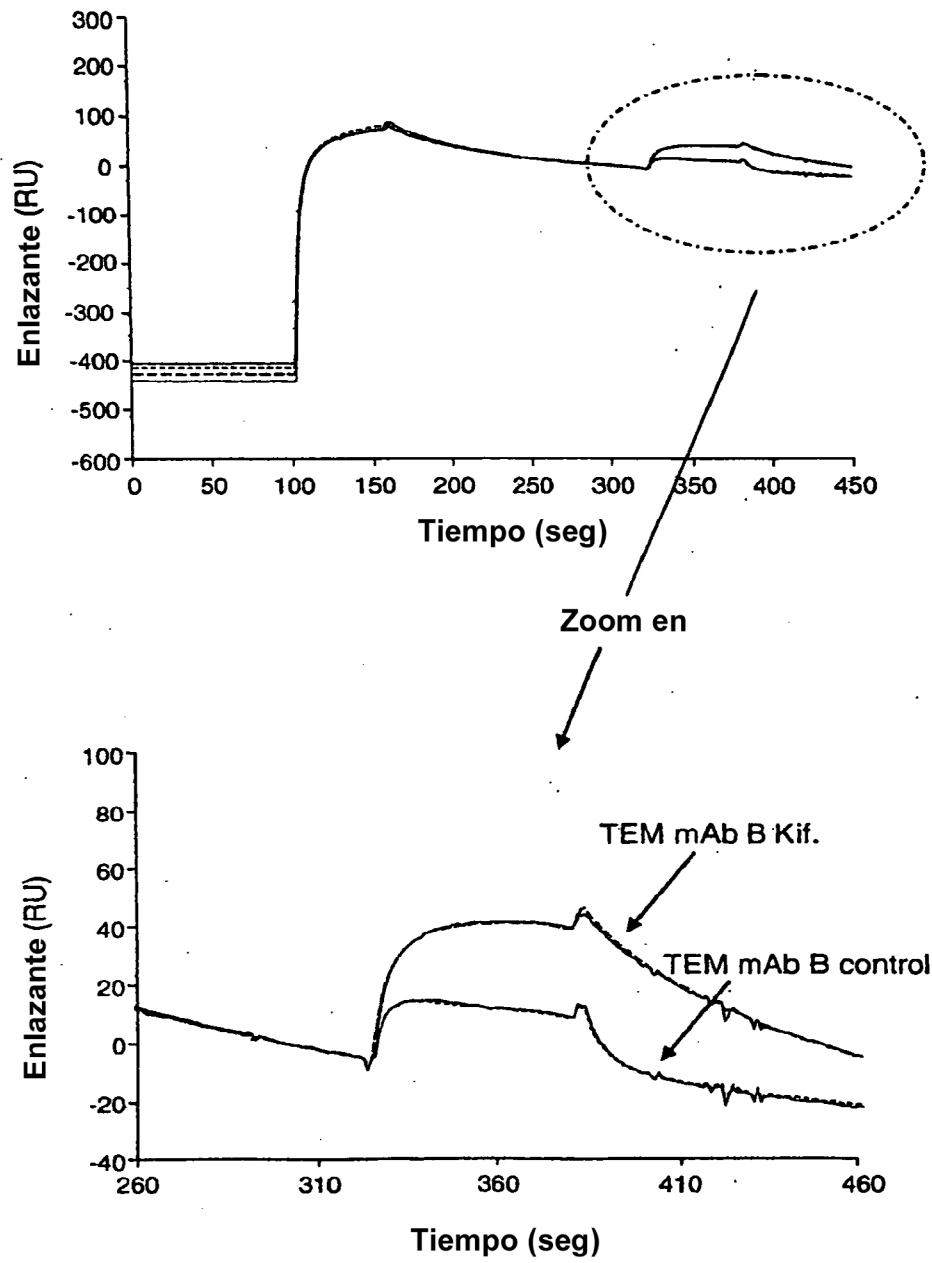


FIG. 7

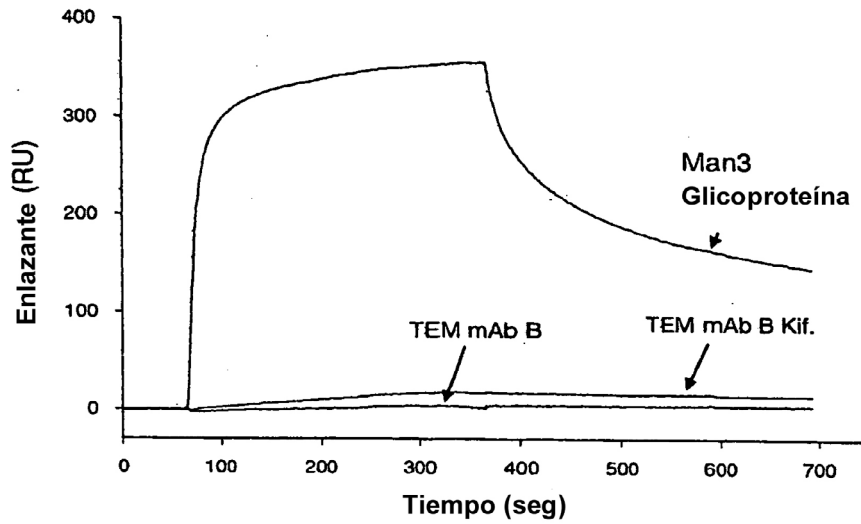


FIG. 8

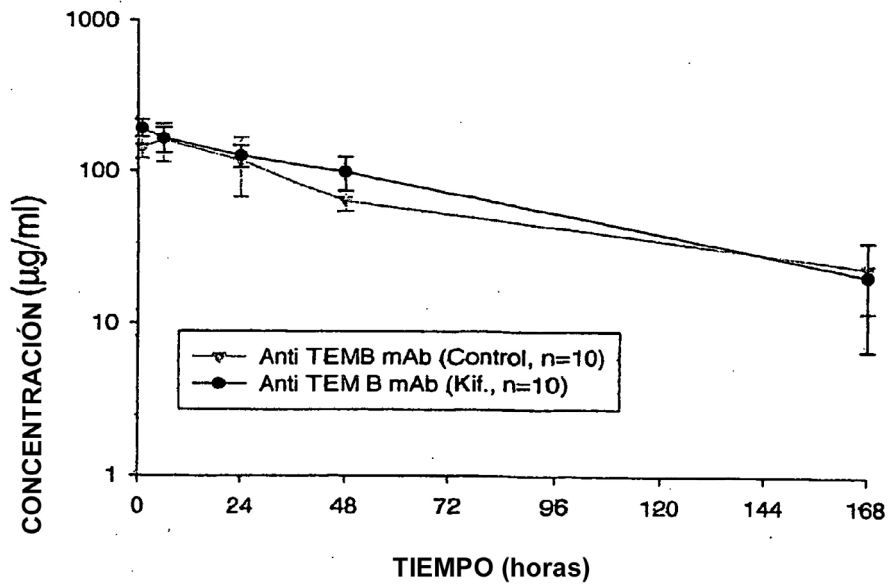


FIG. 9

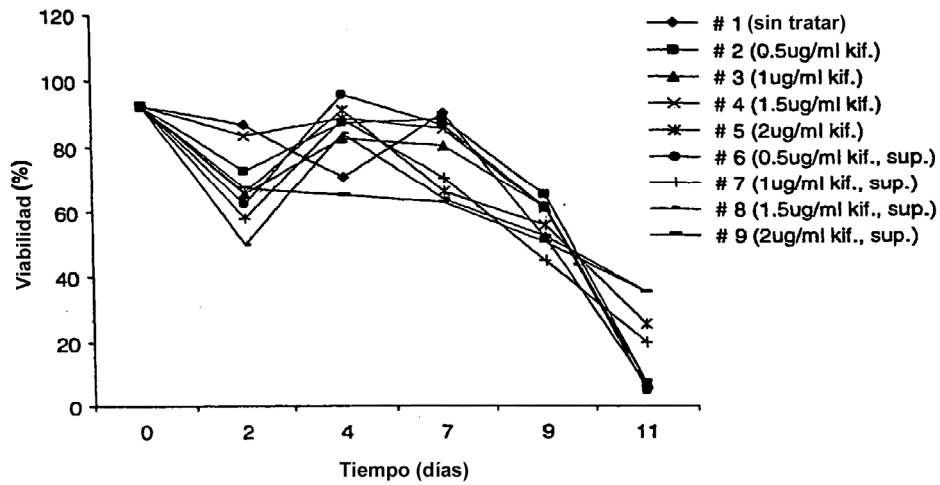


FIG. 10A

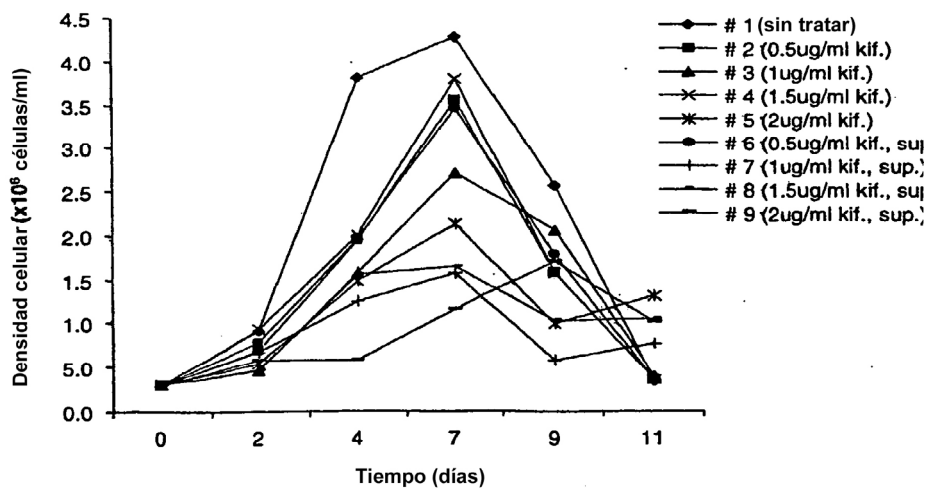


FIG. 10B

FIG. 11A

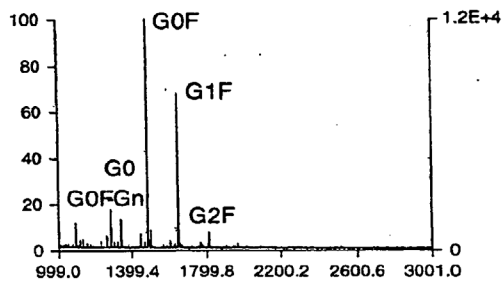


FIG. 11B

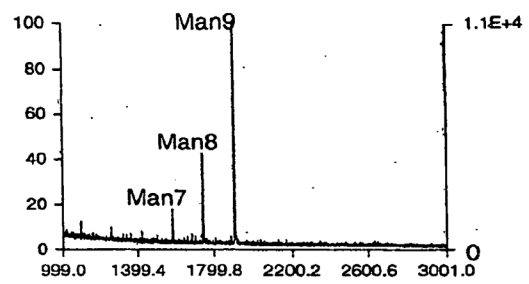


FIG. 11C

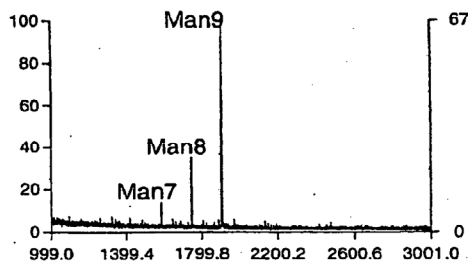


FIG. 11D

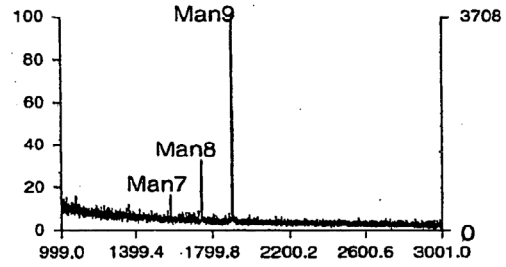


FIG. 11E

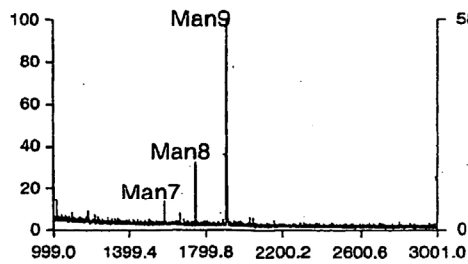
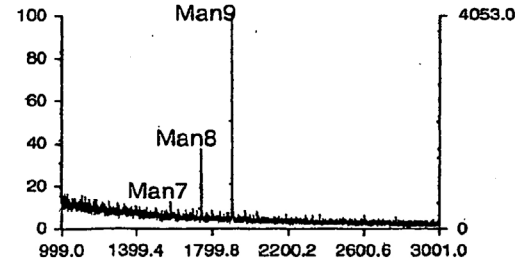
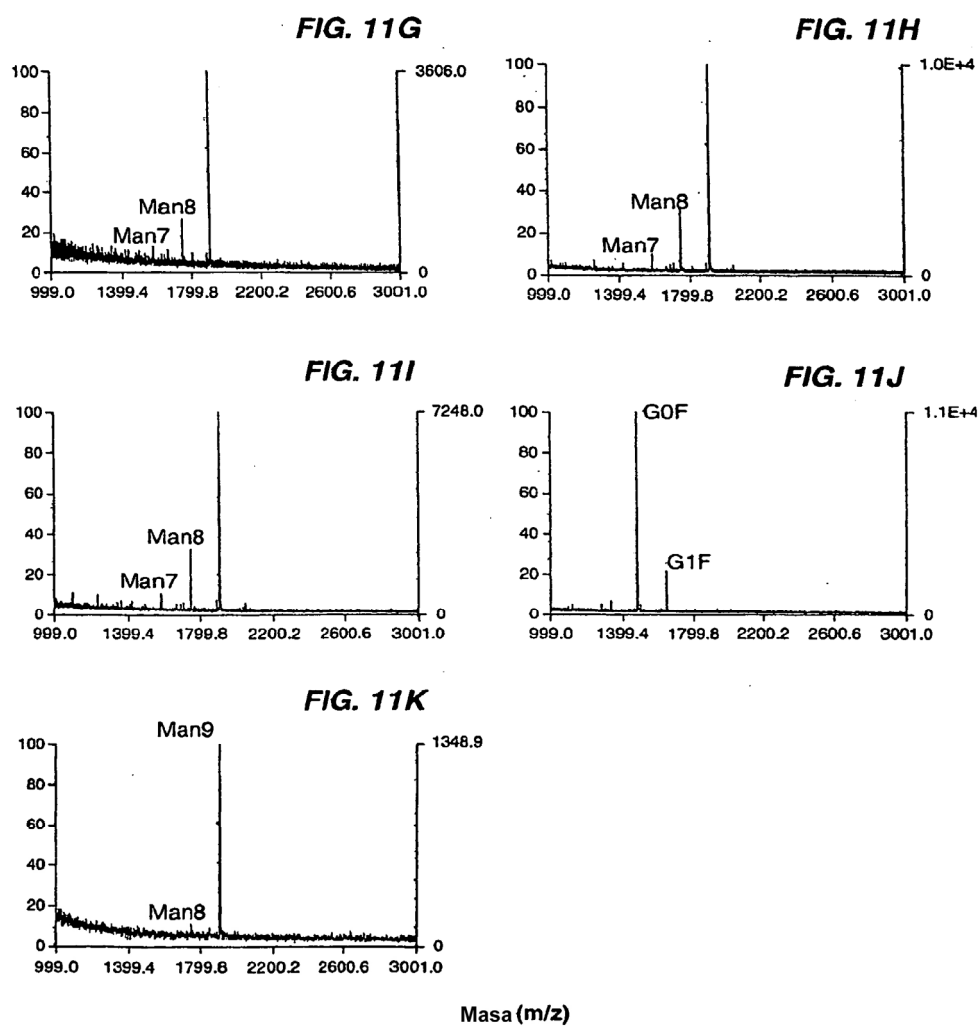


FIG. 11F



Masa(m/z)



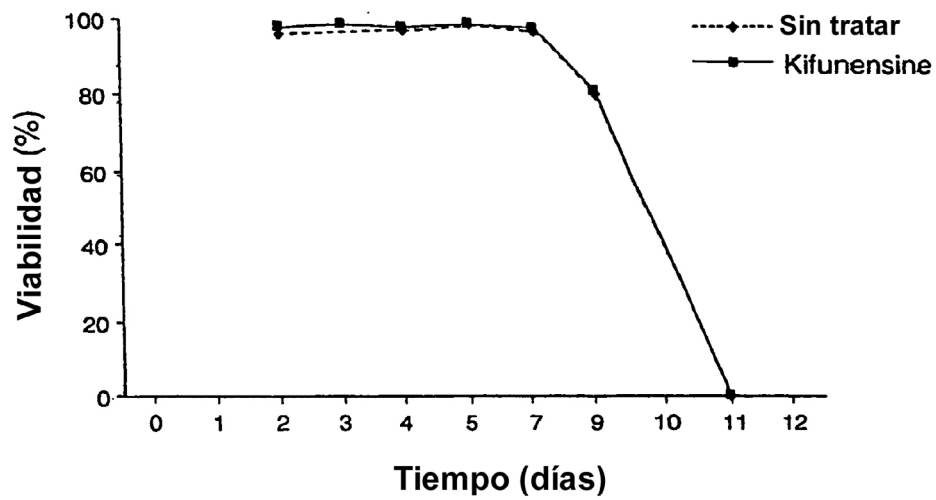


FIG. 12A

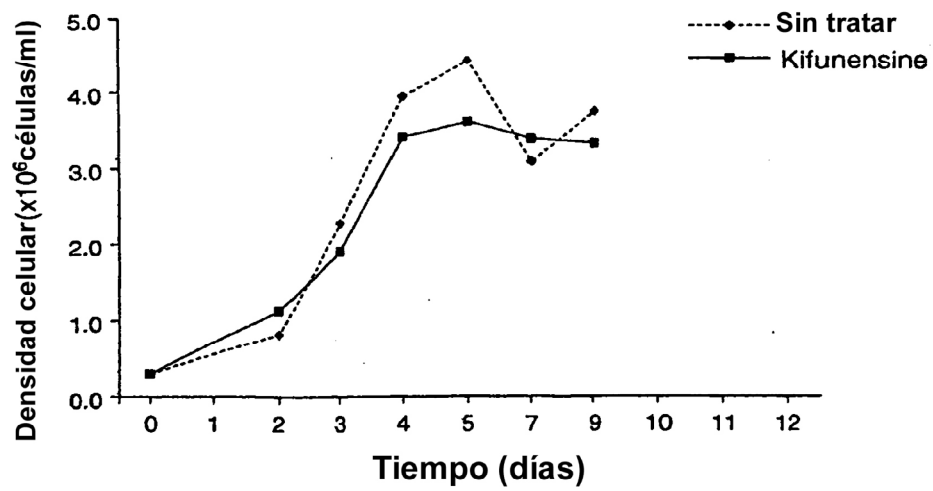


FIG. 12B

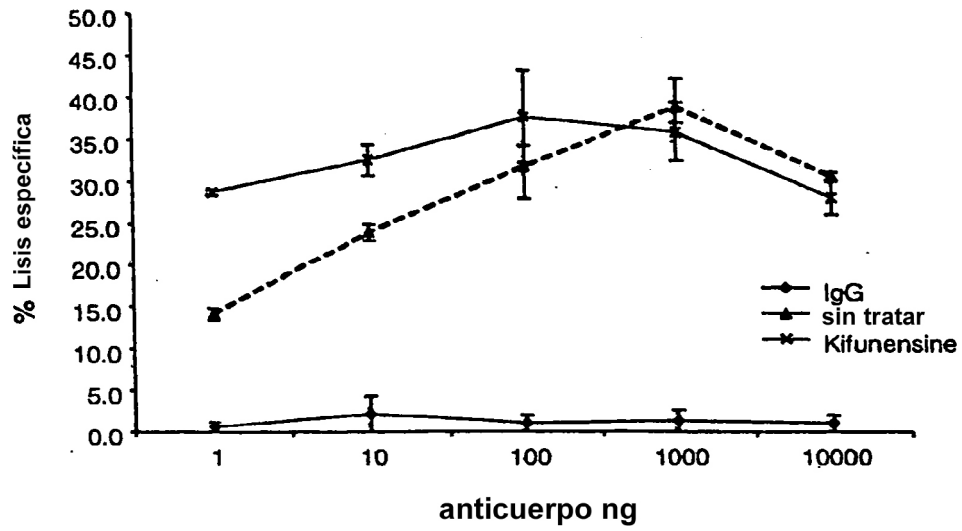


FIG. 13A

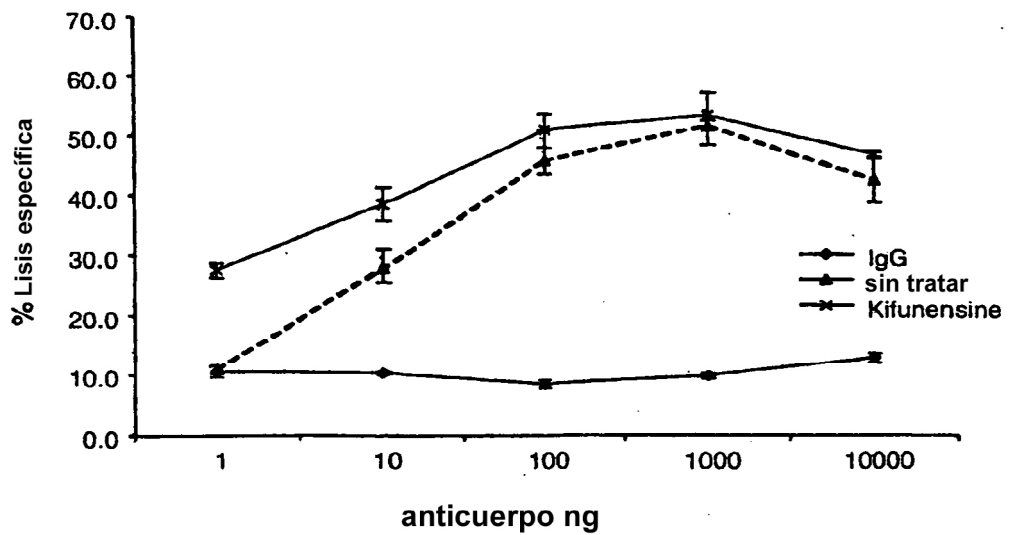


FIG. 13B

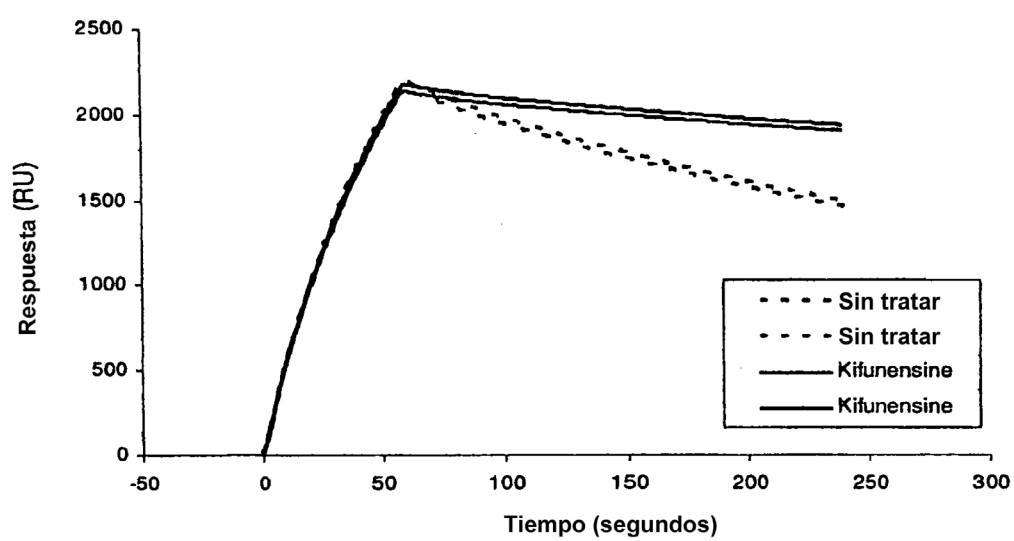


FIG .14

FIG. 15A

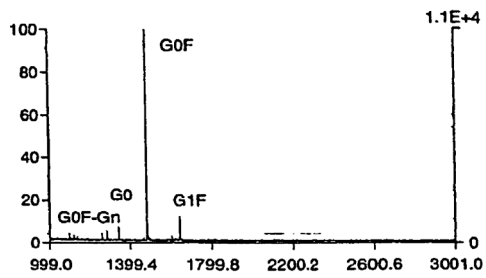


Fig. 15 B

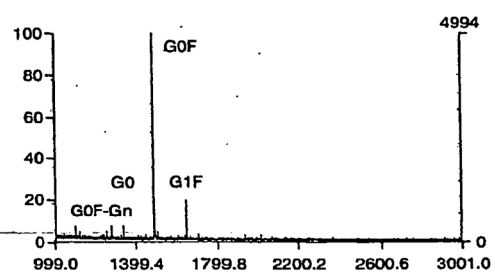


FIG. 15C

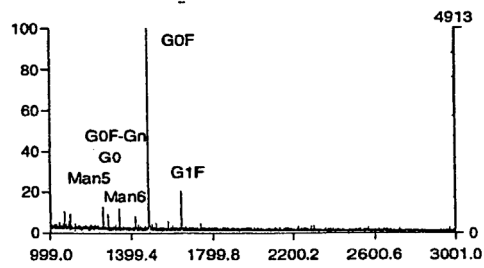


FIG. 15D

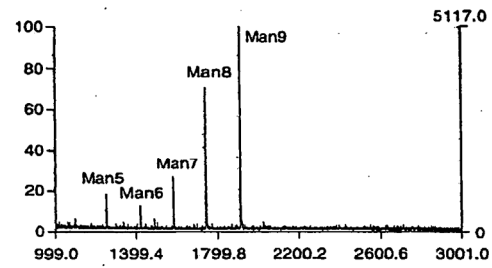


FIG. 15E

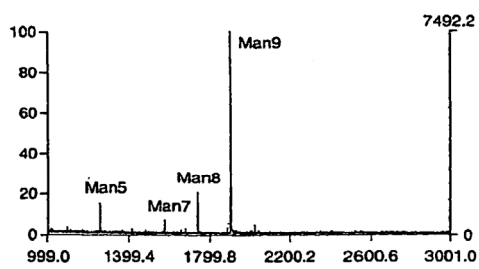
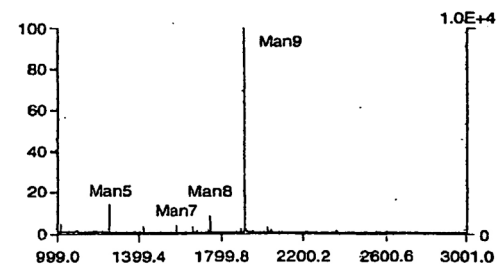


FIG. 15F



Masa(m/z)

FIG. 16A

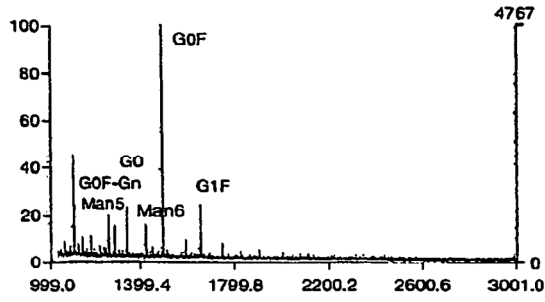


FIG. 16B

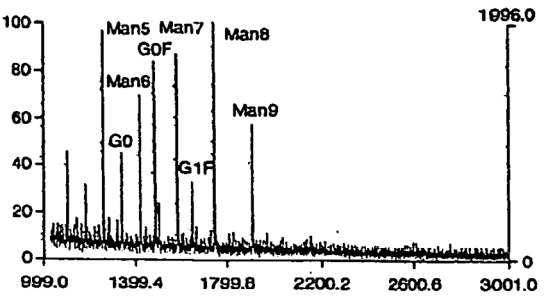


FIG. 16C

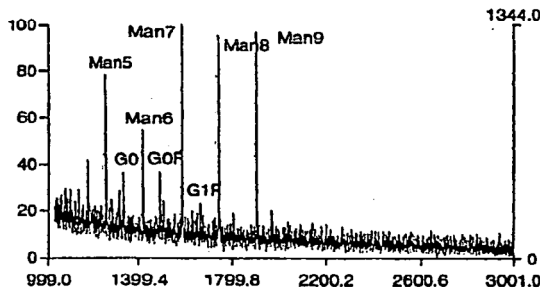


FIG. 16D

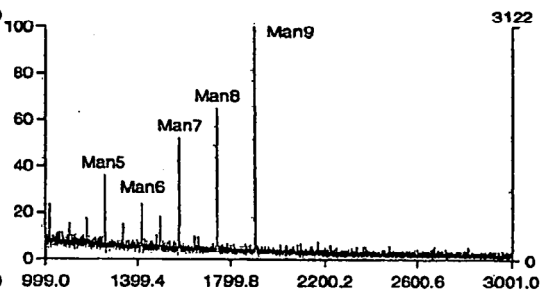
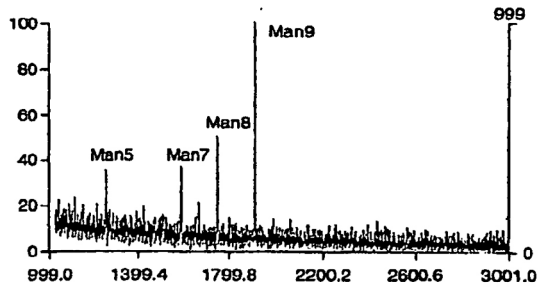


FIG. 16E



Masa (m/z)

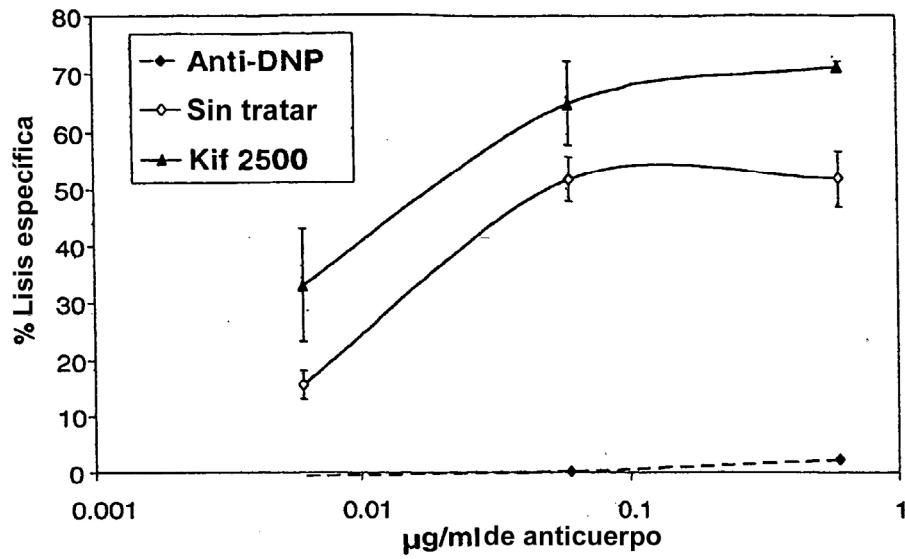


FIG. 17A

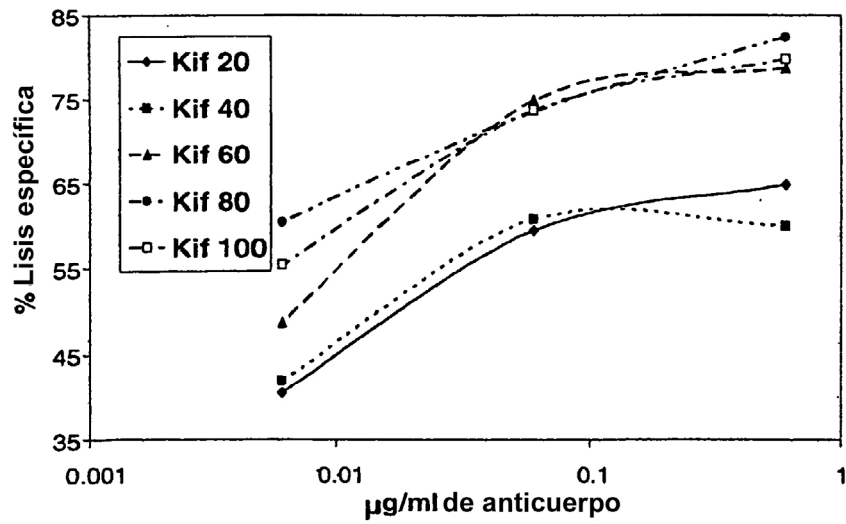
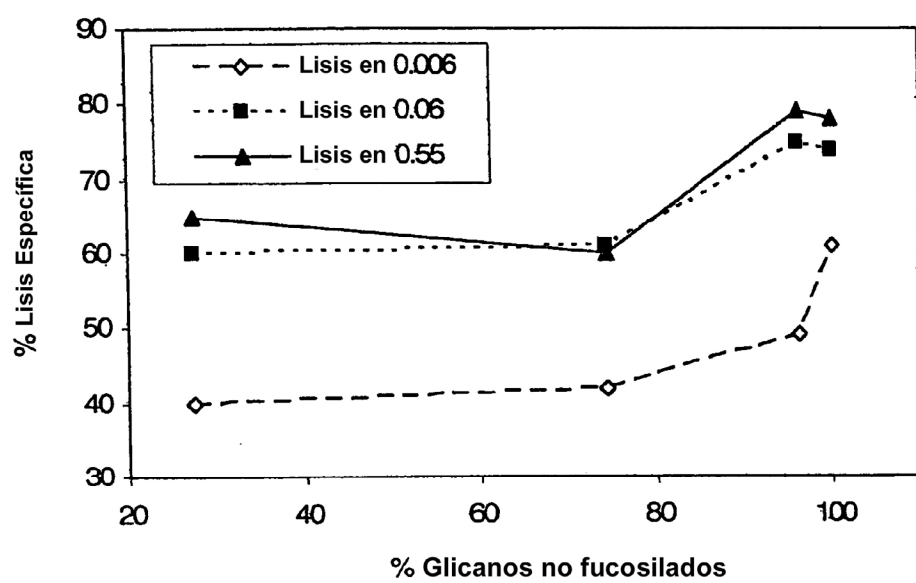


FIG. 17B

**FIG. 18**

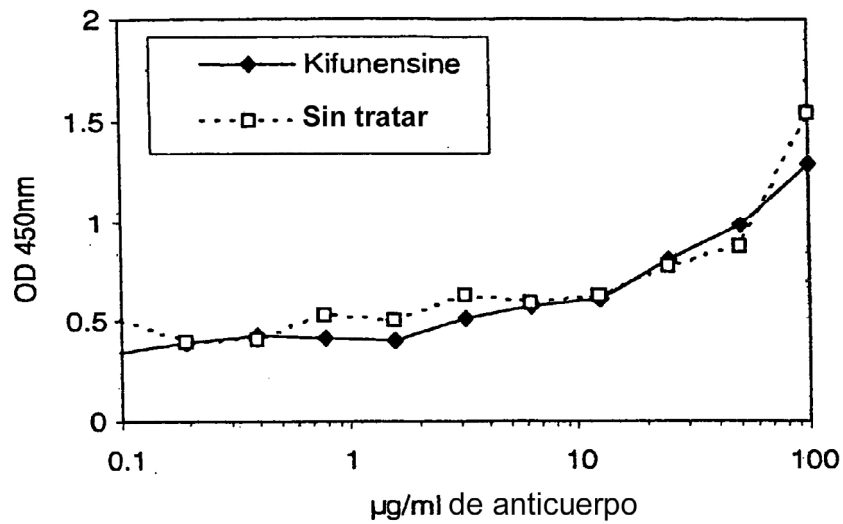


FIG. 19A

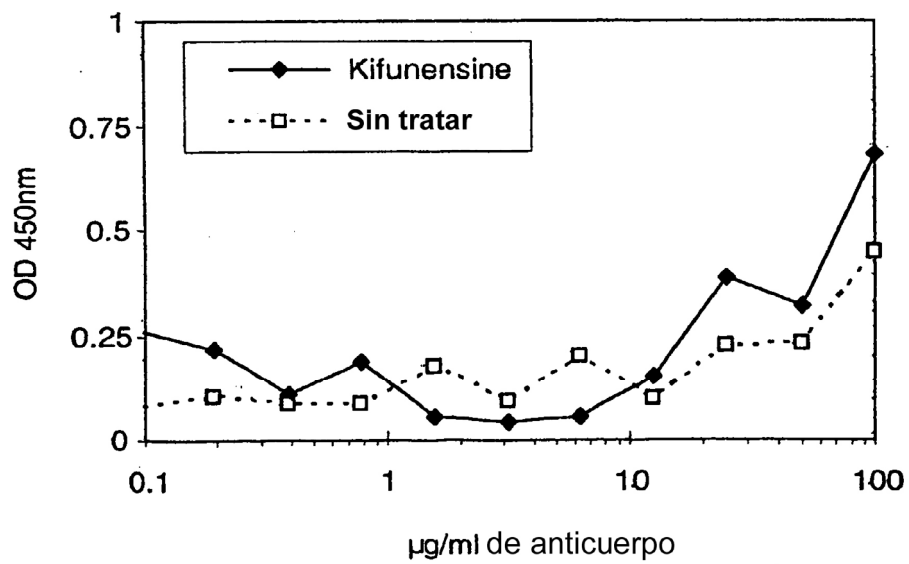
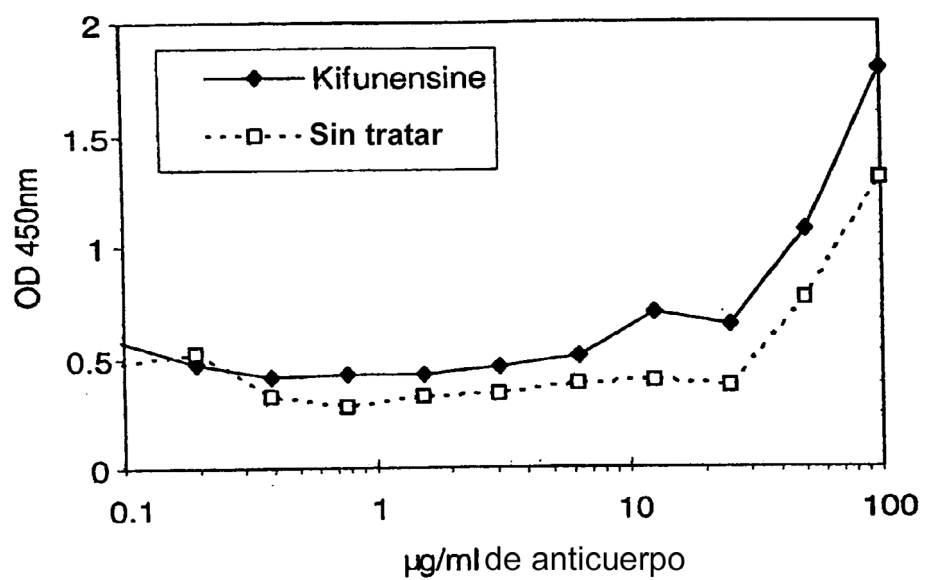


FIG. 19B

**FIG. 19C**