

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 136**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2007 E 07724105 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **31.12.2008 EP 2007809**

54 Título: **Anticuerpos glucosilados**

30 Prioridad:

11.04.2006 EP 06007565
03.08.2006 EP 06016203

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

08.02.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

HANSEN, SILKE;
KUENKELE, KLAUS-PETER;
REUSCH, DIETMAR y
SCHUMACHER, RALF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 395 136 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos glucosilados

- 5 La presente invención está relacionada con un anticuerpo recombinante con una región Fc expresada y glucosilada, en la que la estructura carbohidrato nuclear principal unida a la región Fc del anticuerpo está completamente fucosilada. La presente invención está relacionada también con las células huésped CHO (de ovario de hámster chino), los métodos para seleccionar tales células huésped CHO y la utilización de tal anticuerpo recombinante.
- 10 Antecedentes de la invención
- Las inmunoglobulinas o anticuerpos en su forma nativa normalmente son glucoproteínas tetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Los anticuerpos contienen dominios constantes que sirven para asignar a los anticuerpos en las diferentes clases, como IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, y varias subclases, como IgG1, 15 IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos de humanos de las clases IgG1 e IgG3 a menudo intervienen en la CCDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo).
- También se conocen otras moléculas que son similares a los anticuerpos y contienen, por ejemplo, un dominio de unión de una proteína heteróloga como un receptor, ligando o enzima, y la región Fc de un anticuerpo. Tales 20 proteínas de fusión Fc se describen, por ejemplo, en Stabila, P., et al., *Nature Biotech* 16 (1998) 1357-1360 y la US 5.610.297.
- Los anticuerpos monoclonales son responsables de cuatro funciones efectoras: CCDA, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la tasa de vida media/ eliminación. La CCDA y la fagocitosis están mediadas 25 a través de la interacción de los anticuerpos unidos a la célula con los FcγR (receptores Fc gamma); la CDC a través de la interacción de los anticuerpos unidos a la célula con una serie de proteínas que constituyen el sistema del complemento. La CDC está relacionada con la activación de C3 unido a C1q y/o a la unión con el receptor Fc de la parte Fc. Si debe reducirse la activación de C3 unido a C1q y/o la unión al receptor Fc de la parte constante un anticuerpo, a menudo se utilizan anticuerpos IgG4, que no activan el sistema del complemento, no se unen a C1q y 30 no activan el C3. Alternativamente, se utilizan regiones Fc que comprenden una región constante de la cadena pesada gamma-1 con ciertas mutaciones, como L234A y L235A o D265A y N297A (WO 99/51642).
- Es bien conocida en la material la modificación de los dominios constantes de los anticuerpos para mejorar sus funciones efectoras. Tales métodos se describen, por ejemplo, en la WO 99/54342.
- 35 Routier, F.H. et al., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207 describen el patrón de glucosilación de un anticuerpo IgG1 humanizado expresado en células CHO-DUKX. Este anticuerpo muestra una proporción molar de Fuc: Man de 0,8 : 3,0, lo que indica una proporción de fucosilación del 80%. Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160 describen anticuerpos IgG1 e IgG3 anti-CD20 producidos a través de la recombinación en CHO DG44 con una 40 fucosilación de alrededor del 90%. Mimura, Y et al., *J. Immunol. Methods* 247 (2001) 205-216 describen que el butirato aumenta la producción de IgG quiméricos humanos en las células CHO-K1 manteniendo su funcionalidad y perfil de glucoformas. Los perfiles de oligosacáridos muestran un contenido considerable de estructuras glucano afucosiladas. Raju, T.S., *BioProcess International* 1 (2003) 44-53 describen el impacto de la variación de la glucosilación por los sistemas de expresión en la actividad biológica de las inmunoglobulinas terapéuticas y su nomenclatura. Ma, S., *Anal. Chem.* 71 (1999) 5185-5192 describen el análisis de los carbohidratos del rituximab. El rituximab muestra una fucosilación del 9-10% (Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160). Fujii, S., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6009-6018 describen que la IgG bovina incluye alrededor del 11% de IgG afucosilada. Mizouchi, T., *J. Immunol.* 129 (1982) 2016-2020 describen que la IgG humana está afucosilada en alrededor del 14%. Bergwerff, A.A., *Glycoconjugate J.* 12 (1995) 318-330 describen que los anticuerpos producidos en los ratones 50 SP2/0 contienen oligosacáridos de ácido N-glucosilneuramínico (NGNA) en grandes cantidades. Nahrgang, S. et al., en *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, Bernard, A. et al. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 1999, págs. 259-261, describen que para la expresión en CHO de IgG1 tras la transfección transitoria se encontró una glucosilación total baja. Lund, J. et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 741-748 describen que producción recombinante de un anticuerpo quimérico de ratón-humano en células de transfectoma de ratón. El anticuerpo IgG1 está afucosilado en una cantidad del 13%. Patel, T.P. et al., *Biochem. J.* 285 (1992) 839-845 describen la glucosilación de anticuerpos a partir de células de hibridoma y ascites de ratón. Niwa, R et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160, describen para el anticuerpo IgG1 CD20 una fucosilación del 91% tras una producción recombinante en CHO DG44 y Mori, K. et al., *Biotech. Bioeng.* 88 (2004) 901-908, una fucosilación del 94%. Davies, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2001) 288-294 describen que la expresión de anticuerpos con glucoformas alteradas conduce a un aumento de la CCDA. Por lo tanto, el anticuerpo de Davies no está fucosilado 60 en una cantidad considerable. Sheeley, D.M., et al., *Anal. Biochem.* 247 (1997) 102-110 comparan la glucosilación de los anticuerpos en diferentes sistemas de expresión. Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26733-26740 describen que la ausencia de fucosa en el Fc de la IgG1 humana mejora la unión a FcγRIII y la CCDA. Un anticuerpo anti-Her2 que está fucosilado en alrededor del 90% también muestra CCDA en una cantidad considerable. Zhu, L., et al., *Nature Biotechnol.* 23 (2005) 1159-1169 describen la producción de anticuerpos

humanos en huevos de gallina. Las patentes WO 2004/087756 y WO 2005/005635 describen anticuerpos mejorados frente a IGF-1R.

Resumen de la invención

5 Un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 o IgG3 humano que está glucosilado con una cadena de azúcares en la Asn297, y dicho anticuerpo se caracteriza porque

10 a) la cantidad de fucosa en dicha cadena de azúcares, en relación con la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizado mediante un análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS) es de al menos del 99%,

15 b) y además la cantidad de NGNA en dicha cadena de azúcares, en relación a la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizado mediante análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS), es del 1% o inferior, y/ o la cantidad de alfa 1,3-galactosa N-terminal en dicha cadena de azúcares en relación a la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizada mediante análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS) es del 1% o inferior.

20 De acuerdo con la invención "cantidad" significa la cantidad de dicho azúcar en la cadena de azúcares en la Asn297, en relación con la suma de G0, G1, G2 (sin manosa (4 y 5)), del 100% y como se calcula en el ejemplo 3.

De acuerdo con la invención es posible proporcionar anticuerpos y/o células CHO huésped con una fucosilación de incluso el 99,4% o superior, 99,5% o superior, o 99,9% o superior.

25 Preferiblemente la cantidad de NGNA es del 0,5% o inferior, más preferiblemente del 0,1% o inferior, e incluso no detectable mediante LCMS (cromatografía líquida / espectrometría de masas).

Preferiblemente la cantidad de alfa 1,3-galactosa N-terminal es del 0,5% o inferior, más preferiblemente del 0,1% o inferior e incluso no detectable mediante LCMS.

30 La cadena de azúcares preferiblemente poseen las características de los glucanos N-ligados, y está unida a la Asn297 de un anticuerpo expresado de forma recombinante en una célula CHO.

35 Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano, quimérico.

40 La invención también comprende la línea celular CHO hu MAb<IGF-1R>B1-4E10_9-16) depositada bajo el tratado de Budapest de reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con el propósito de iniciar un proceso de patente, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 21 de junio de 2006, con el nº de registro DSM ACC 2795. Esta línea celular es capaz de producir un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Las cantidades de azúcar preferibles se mencionan anteriormente.

45 Preferiblemente, la célula CHO es una célula CHO que comprende la delección (por ejemplo DG44) o la inactivación funcional de ambos alelos DHFR o una delección de un alelo DHFR y una inactivación funcional del segundo alelo DHFR (por ejemplo DXB11).

50 La invención también comprende una composición de acuerdo con la invención para su utilización en la terapia médica humana.

55 El anticuerpo de la composición de acuerdo con la invención preferiblemente es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo no humano, un anticuerpo de cadena sencilla que comprende la parte constante de la cadena pesada de la IgG1 o IgG3, o una parte constante de la cadena pesada de la IgG1 o IgG3.

La invención también comprende una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

60 Otro objeto de la invención es un método para la selección de una célula CHO para la producción recombinante de un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 o IgG3 humano que está glucosilado con una cadena de azúcares en la Asn297, y dicho anticuerpo se caracteriza porque la cantidad de fucosa en dicha cadena de azúcares es de al menos del 99%, y además la cantidad de NGNA es del 1% o inferior, y/ o la cantidad de alfa 1,3-galactosa N-terminal es del 1% o inferior, y dicho método comprende el cultivo de una célula CHO, transfectada con un anticuerpo IgG1 o IgG3 y un gen DHFR, bajo presión selectiva de DHFR y MTX, el picado de clones únicos y la

expansión de los clones, y la selección de un clon que produzca un anticuerpo con el patrón de glucosilación de acuerdo con la invención. Preferiblemente el cultivo se realiza durante al menos dos, y preferiblemente al menos tres semanas.

5 Otro objeto de la invención es la utilización de una célula CHO de acuerdo con la invención para la producción recombinante de un anticuerpo monoclonal.

Otro objeto de la invención es un método para la producción recombinante de un anticuerpo monoclonal en una célula CHO de acuerdo con la invención.

10

La célula CHO es una célula huésped que es útil para la expresión recombinante de polipéptidos heterólogos.

Breve descripción de las figuras

15 La figura 1 es un diagrama de barras que muestra la actividad de CCDA o la ausencia de la misma con los anticuerpos de la invención y con los anticuerpos control y comparativos.

Descripción detallada de la invención

20 Los anticuerpos contienen estructuras carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, y cada isotipo posee una disposición distinta de estructuras carbohidrato N-ligadas, que afectan de forma variable al ensamblado, secreción o actividad funcional de la proteína (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). La estructura del carbohidrato N-ligado unido varía considerablemente, dependiendo del grado de procesado, y puede incluir elevada manosa, múltiples ramificaciones, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32).

25

Los anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 son glucoproteínas que poseen un lugar de glucosilación N-ligado conservado en la Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 están ocultos entre los dominios CH2, que forman contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es esencial para el anticuerpo para mediar en funciones efectoras, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Lifely, M.R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32).

30

Como se utiliza aquí, el término "región Fc del tipo IgG humano" preferiblemente incluye también las variantes alélicas de aparición natural en la región Fc de una inmunoglobulina (anticuerpo), así como las variantes con alteraciones que pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones, pero que no afectan a la glucosilación en la Asn297. Por ejemplo, pueden deleccionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin eliminar de forma sustancial su función biológica. Tales variantes pueden seleccionarse de acuerdo con las reglas generales conocidas en la materia, de forma que posean unos efectos mínimos en la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J.U., et al., Science 247 (1990) 1306-1310).

35

El término "anticuerpo" incluye varias formas de anticuerpos, lo que incluye pero no se limita a los anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y los anticuerpos modificados mediante ingeniería genética, siempre que mantengan las propiedades características de acuerdo con la invención. Por lo tanto, un anticuerpo de acuerdo con la invención contiene al menos una parte Fc funcionalmente activa (de unión a FcR) de tipo IgG1 o IgG3 y que comprende la Asn297 glucosilada.

40

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de secuencia de aminoácidos idéntica. De acuerdo con esto, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a los anticuerpos que muestran una única especificidad de unión, y que poseen las regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

45

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de un origen o especie, y al menos una porción de una región constante derivada de un origen o especie diferente, que normalmente se obtiene mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una a región variable murina y una región constante humana son especialmente preferibles. Tales anticuerpos quiméricos murino/ humano son el producto de la expresión de genes de las inmunoglobulinas que comprenden segmentos de DNA que codifican regiones variables de inmunoglobulinas murinas y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulinas humanas. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos involucran las técnicas de DNA recombinante convencionales y las de transfección génica, ahora bien conocidas en la materia (véanse por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855, y las patentes estadounidenses N° 5.202.238 y 5.204.244).

50

55

60

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos en los que las regiones marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para que comprenda la CDR de una

65

5 inmunoglobulina de diferente especificidad, comparado con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferible, una CDR murina se introduce en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado" (véase por ejemplo, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327, y Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270). En particular, las CDR preferibles corresponden a las aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos anteriormente mencionados para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

10 El término "anticuerpo humano", como se utiliza aquí, se pretende que incluya anticuerpos con las regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales regiones se describen en, por ejemplo., Johnson, G., y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218 y en las bases de datos a las que se hace referencia en éste, y son útiles siempre que se mantengan las propiedades de acuerdo con la invención. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en la materia (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. La transferencia de la disposición de los genes de las inmunoglobulinas de línea germinal humana a tales ratones mutantes en línea germinal resulta en la producción de anticuerpos humanos tras una exposición al antígeno (véase por ejemplo, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse en bibliotecas de exposición en fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388, Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); y Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Un anticuerpo humano incluye varias formas de anticuerpos, y preferiblemente los anticuerpos monoclonales incluyen pero no se limitan a los anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos modificados mediante ingeniería genética (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que se mantengan las propiedades características de acuerdo con la invención. Son especialmente preferibles los anticuerpos humanos recombinantes.

30 El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se pueden obtener, expresar, crear o aislar mediante métodos recombinantes, como los anticuerpos aislados de una célula huésped de acuerdo con la invención, utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en tal célula huésped.

35 Los "dominios constantes" no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero poseen otras funciones, como las funciones efectoras. Las regiones constantes de la cadena pesada que se corresponden con la IgG1 se denominan cadena γ 1. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a la IgG3 se denominan cadena γ 3. Las cadenas pesadas γ constantes humanas se describen en detalle en Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y en Brueggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527. Los dominios constantes de los tipos IgG1 o IgG3 están glucosilados en la Asn297. "Asn 297" de acuerdo con la invención se refiere al aminoácido asparagina situado alrededor de la posición 297 de la región Fc; en base a variaciones menores de secuencia de los anticuerpos, la Asn297 también puede estar situada algunos aminoácidos (habitualmente no más de ± 3 aminoácidos) río arriba o río abajo. Por ejemplo, en un anticuerpo de acuerdo con la invención, "Asn297" está situado en la posición aminoácida 298.

45 La glucosilación de las IgG1 o IgG3 humanas ocurre en la Asn297 como una glucosilación en forma de oligosacárido complejo biantenarico de núcleo fucosilado y terminado con hasta 2 residuos Gal (galactosa). Estas estructuras se denominan residuos glucanos G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju, T.S., *BioProcess International* 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc del anticuerpo se describe por ejemplo en Routier, F. H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207.

50 La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL) o región variable de una cadena pesada (VH)) como se utiliza aquí indica cada uno de los pares de cadenas ligeras y pesadas que están involucradas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno.

55 De acuerdo con la invención, una célula huésped CHO que produce un anticuerpo puede seleccionarse de forma que proporcione mediante una expresión recombinante una composición de un anticuerpo monoclonal que muestra un patrón de glucosilación de acuerdo con la invención. Tal célula huésped CHO comprende uno o más vectores de expresión para la expresión recombinante de tal anticuerpo. Preferiblemente, la célula huésped se ha sometido a una transfección estable con el vector o los vectores, y los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo están integrados en el genoma de la célula huésped CHO.

65 El término "célula CHO" incluye varias formas de células de ovario de hámster chino (CHO) que se basan en que los dos alelos de la dhfr están inactivados funcionalmente, preferiblemente delecionados (deficientes en la dihidrofolato reductasa (dhfr-)). Tales células dhfr- y los métodos para su obtención se describen por ejemplo en Urlaub, G., et al., *Cell* 33 (1983) 405-412; Urlaub, G. et al., *Som. Cell Molec. Genet.* 12 (1986) 555-566, y Kolkekar et al., *Biochemistry*

36 (1997) 10901-10909. Preferiblemente, la célula es una línea celular DG44. Tales células CHO dhfr- pueden obtenerse utilizando radiación gamma para eliminar el locus dhfr completo. En las células salvajes, no mutadas, la dhfr es una enzima esencial para la síntesis *de novo* de glicina, purinas y timidilato. Esto permite la utilización del gen dhfr codificado en plásmidos como un marcador seleccionable dominante y como un amplificador génico para la expresión de proteínas en líneas celulares deficientes en dhfr. La mutación dhfr- en las células DG44 es estable e irreversible. Las células CHO que se han cotransfectado con éxito con el vector o los vectores de expresión de un anticuerpo de tipo IgG1 o IgG3 humano y el gen DHFR mostraron un fenotipo dhfr+ y pueden seleccionarse fácilmente mediante un cultivo de las colonias en un medio que carece de timidina e hipoxantina, y que opcionalmente contiene metotrexato (MTX) para su amplificación.

Las células DG44 son bien conocidas en la materia y están disponibles a nivel comercial como líneas celulares por ejemplo de Invitrogen Corp. (USA). Las células DG44 pueden crecer en adherencia, en suspensión y/o en medio libre de suero. Como se utiliza aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan de forma intercambiable y todas estas denominaciones de las líneas celulares CHO dhfr- (con los dos alelos de dhfr delecionados) incluyen su progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen las células sujeto primario y los cultivos derivados de las mismas, sin importar el número de pases de siembra. También debe entenderse que toda la progenie puede no ser idéntica de forma precisa en su contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que posee las propiedades de glucosilación de acuerdo con la invención tal y como se seleccionaron en la célula transformada originalmente.

Preferiblemente, la línea celular CHO dhfr- se coamplifica con al menos DHFR como gen marcador seleccionable. Por ejemplo, un vector de expresión en mamíferos que contiene el marcador o marcadores seleccionables y el gen del anticuerpo se cotransfectan en células CHO receptoras. Las colonias receptoras pueden seleccionarse y estas colonias que muestran el fenotipo esperado pueden expresar el anticuerpo. Los marcadores seleccionables adicionales pueden ser o no ser de naturaleza dominante. Ejemplos de marcadores seleccionables adicionales para su utilización en la cotransfección incluyen la adenosina deaminasa (Kaufman, R.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 3136-3140) asparagina sintetasa (Cartier, M., et al., Mol. Cell Biol. 7 (1987) 1623-1628), gen *trpB* de *E. coli* y gen *hisD* de *Salmonella* (Hartman, S.C., y Mulligan, R.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 8047-8051), ribonucleótido reductasa de ratón M2 (Thelander, M., y Thelander, L., EMBO J. 8 (1989) 2475-2479), gen de resistencia a múltiples fármacos humano (Kane, S.E., et al., Gene 84 (1989) 439-446), glutamina sintetasa (Bebington, C.R. et al., DNA Cloning, Vol. III, D.M. Glover (Ed.), IRL Press, págs. 163-188, 1987), xantina guanina fosforibosiltransferasa (*gpt*) (Mulligan, R.C., y Berg, P., Science 209 (1980) 1422-1427), higromicina B (Santerre, R.F., et al., Gene 30 (1984) 147-156), gen de la neomicina (Southern, P.J., y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) 327-341). Los marcadores seleccionables también pueden proporcionar la base para que los genes que codifican el anticuerpo puedan amplificarse. En la cotransfección de una línea celular CHO, el DNA del vector a menudo se integra en el cromosoma de la célula en el mismo locus. Por lo tanto, la utilización de solo uno de los marcadores seleccionables como base para la amplificación normalmente resulta en un aumento en paralelo del número de copias de ambos genes. Un marcador seleccionable en particular para su utilización de este modo es dhfr, que permite la obtener la amplificación deseada a través de la utilización de concentraciones crecientes de MTX. Un segundo marcador seleccionable preferible es GS, que permite la amplificación mediante la adición de metionina sulfoximina (MSX).

Por supuesto, los marcadores seleccionables están bajo el control de elementos regulatorios de DNA, de forma que proporcionan su expresión. En el caso de la utilización de dhfr como marcador seleccionable, los elementos regulatorios preferiblemente son de origen viral, como por ejemplo de DNA de virus tumorales. En particular, es preferible la utilización de un promotor tardío principal de SV40 o adenovirus. Con este propósito, es especialmente ventajoso eliminar el elemento potenciador del promotor, incapacitándolo así de forma efectiva. Esta modificación permite que se produzcan niveles aumentados de amplificación génica en cada selección por concentración de metotrexato, que se produciría de otro modo si se utilizara un promotor fuerte. En el caso de la utilización de neomicina como marcador seleccionable, un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor de la metalotioneína de ratón.

El término ácido nucleico o molécula de ácido nucleico, como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferiblemente es un DNA de doble cadena.

Un ácido nucleico está "ligado de forma operativa" cuando está situado en una relación funcional junto a otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o líder de secreción está ligado de forma operativa al DNA de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador está ligado de forma operativa a una secuencia codificante si este afecta la transcripción de la secuencia; o un lugar de unión a ribosoma está ligado de forma operativa a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilita la traducción. Generalmente, "ligado de forma operativa" significa que las secuencias de DNA están ligadas en *cis*, y en el caso de un líder de secreción, de forma contigua y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no han de estar situados de forma contigua. La unión se consigue mediante ligación en las dianas de restricción adecuadas. Si tales dianas no existen, se utilizan

adaptadores o enlazantes de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente mediante métodos recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en la materia y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento del polipéptido del anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza aceptable a nivel farmacéutico. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de las cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas, se insertan en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped CHO y el anticuerpo se recupera de las células o del sobrenadante, preferiblemente tras una lisis.

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la materia y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos pueden estar presentes en células completas, en el sobrenadante, en un lisado celular, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza de forma que se eliminen otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, lo que incluye el tratamiento alcalino/ SDS, las bandas en CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otros bien conocidos en la materia (véase Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York (1987)).

Las secuencias de control que son adecuadas para las procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operador, y un lugar de unión a ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Los anticuerpos monoclonales pueden separarse adecuadamente del medio de cultivo de un hibridoma mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales como, por ejemplo, la proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y RNA que codifican los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente del hibridoma y se secuencian utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tal DNA y RNA. Una vez identificado y aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células CHO que de otro modo no producen las proteínas de las inmunoglobulinas, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende una composición de la presente invención, formulada junto con un transportador aceptable a nivel farmacéutico. Preferiblemente, se utiliza una composición farmacéutica de acuerdo con la WO 98/22136. Tal composición contiene, por ejemplo en 1 ml, 2,0 mg de anticuerpo, tampón fosfato 15 mM pH 6,5, cloruro sódico 30 mM, 25 mg de manita, 10 mg de arginina, 0,1 mg de Tween®20.

Como se utiliza aquí, "transportador aceptable a nivel farmacéutico" incluye cualquiera de todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares que sean compatibles a nivel fisiológico. Preferiblemente, el transportador es adecuado para su administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

Una "sal aceptable a nivel farmacéutico" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del anticuerpo y no aporta ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo Berge, S.M., et al., *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19). Tales sales están incluidas en la invención. Ejemplos de tales sales incluyen las sales de adición ácida y las sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, como las sales de clorhidrato.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una serie de métodos conocidos en la materia. Como el experto en la materia apreciará, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

Para administrar un compuesto de la invención a través de ciertas vías de administración, puede ser necesario el recubrimiento del compuesto o la coadministración del compuesto con un material que evite su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un transportador apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes aceptables a nivel farmacéutico incluyen las soluciones salinas y los tampones acuosos.

Los transportadores aceptables a nivel farmacéutico incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de tales medios y agentes para las sustancias activas a nivel farmacéutico es conocida en la materia.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se utilizan aquí significan vías de administración distintas de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, y la infusión.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes como los conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. Puede asegurarse que se evita la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, supra, como mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes de isotonicidad, como los azúcares, cloruro sódico y similares a las composiciones. Además, puede conseguirse una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción como el monostearato de aluminio y la gelatina.

Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, están formuladas en formas de dosificación aceptables a nivel farmacéutico mediante los métodos convencionales conocidos para los expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectivo en la obtención de la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y vía de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una serie de factores farmacocinéticos, lo que incluye la actividad de las composiciones de la presente invención particulares utilizadas, o del éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto en particular a utilizar, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

La composición debe ser estéril y fluida en una medida que permita que la composición sea administrable mediante una jeringa. Además de agua, el transportador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los anteriores.

La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol o sorbitol, y cloruro sódico a la composición. Puede conseguirse una absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Los siguientes ejemplos y la figura se proporcionan para mejorar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se indica en las reivindicaciones anexas. Se entenderá que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

Ejemplos

Líneas celulares

La línea celular parental utilizada para la generación de una línea celular para la expresión de IgG recombinante es una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), la CHO-DG44 (Flintoff, W.F. et al., *Somat. Cell Genet.* 2 (1976) 245-261; Flintoff, W.F. et al., *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 275-285; Urlaub, G. et al., *Cell* 33 (1983) 405-412; Urlaub, G. et al., *Somat. Cell Mol. Genet.* 12 (1986) 555-566). Las células CHO-DG44 han perdido los dos locus endógenos de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).

Las células CHO-DG44 se hicieron crecer en medio MEM alpha Minus (Gibco N° 22561), FCS dializado al 10% (Gibco N° 26400-044) y L-glutamina 2 mmol/L, hipoxantina 100 µM, timidina 16 µM (suplemento HT).

Plásmidos

El sistema de expresión comprende el promotor del CMV y se describe en la Tabla 1. Como anticuerpo se utilizó un anticuerpo frente a IGF-1R (WO2005005635; AK18 o AK22).

Tabla 1

pB	Elemento del vector / segmento de DNA
1-26	Dianas de restricción únicas: SgrAI, Sse83871
27-614	Promotor del citomegalovirus humano (HCMV) (CMV-Prom) que incluye el promotor IE del CMV humano IE e incluye una 5'-UTR sintética
615-641	Enlazante
642-780	secuencia líder de la cadena pesada de Ig murina (L1, intrón secuencia señal, L2)
642-686	L1
687-768	Intrón señal (intrón SS)
769-780	L2
781-1105	Dominio variable de la cadena ligera κ del anticuerpo IGF-1R (AK18)
1106-1140	Enlazante
1141-3134	Intrón 2 de la cadena ligera κ híbrido humano/ de ratón
2433-2913	Fragmento del potenciador κ
3135-3475	Enlazante
3476-3795	Región constante de la cadena ligera κ (C-kappa)
3796-4098	Secuencia de poliadenilación de la cadena ligera κ de la Ig humana (C-kappa pA)
4099-4137	Enlazante
4138-5800	Resistencia a la higromicina
4138-4485	Promotor del SV40 (SV40 Prom) que incluye una repetición de 72 pb, TATA y origen del SV40
4486-4502	Enlazante
5403-5528	Higromicina-B-fosfotransferasa (Hyg)
5529-5535	Enlazante
5536-5795	Señal del poliadenilación del SV40 (SV40 pA)
5796-5800	Enlazante
5801-6944	Dihidrofolato reductasa (DHFR) murina
5801-6088	Promotor del SV40 (SV40 Prom), incluye una repetición de 72 pb acortada y el origen del SV40
6089-6105	Enlazante
6106-6672	gen de la DHFR murina (DHFR murino)
6673-6679	Enlazante
6680-6944	Señal de poliadenilación del SV40 (SV40 pA)
6945-7181	Enlazante
7182-8941	Origen de replicación bacteriano y marcador selectivo derivado del plásmido pUC18
7182-7792	Origen de replicación ("origen pUC")
7793-7939	Enlazante
7940-8847	Gen de la β -Lactamasa (Ap(r))
8848-8941	Enlazante
8942-9529	Promotor del citomegalovirus humano (HCMV) (CMV-Prom) que incluye el promotor IE del CMV humano e incluye la 5'-UTR sintética
9530-9556	Enlazante
9557-9696	Secuencia líder de la cadena de Ig murina (L1, intrón secuencia señal, L2)
9557-9602	L1
9603-9685	Intrón señal (intrón SS)
9686-9696	L2
9697-10051	Dominio variable de la cadena pesada de la IgG1 del anticuerpo IGF-1R (AK18)
10052-10085	Enlazante
10086-11682	Intrón 2 de la cadena pesada híbrido humano/ de ratón que incluye la parte de la región del segmento J de la cadena pesada de la Ig de ratón, que incluye el elemento potenciador de la cadena pesada de la Ig (parte JH3, JH4). Elemento potenciador de la cadena pesada de la Ig de ratón.
11683-11909	Enlazante
11910-13504	Región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana (CH1-bisagra-CH2-CH3)
11910-12203	CH1
12594-12638	Bisagra
12757-13086	CH2
13184-13504	CH3 (lugar de corte y empalme alternativo delecionado)
13505-13967	Secuencia de poliadenilación de la cadena pesada de la IgG1 humana (IgG1 pA)
13968-13970	SgrAI-Enlazante

Ejemplo 1 Transfección y selección

- 5 La transfección del plásmido de expresión se realizó con Fugene (Roche Diagnostics GmbH). Un día después de la transfección, las DG44 células se sometieron a presión selectiva, que consistió en el medio MEM alpha Minus, FCS

dializado al 10% y L-glutamina 2 mmol/L y metotrexato 20 nM (MTX). Tras 3 semanas bajo presión selectiva, se picaron clones individuales de la placa y se expandieron.

5 Los sobrenadantes se recogieron y la presencia del anticuerpo se analizó con un ELISA específico de IgG humana. Los subclones se expandieron posteriormente y se analizó la producción de anticuerpos específicos.

10 Los clones se adaptaron a crecer en cultivo en suspensión y en medio libre de suero, HyQ SFM4 CHO-Utility (HyClone nº SH30516) que contenía MTX 20 nM. En paralelo, se determinó el perfil del glucopatrón. Se seleccionaron los subclones que proporcionaron una defucosilación del 2,0% o inferior (referida a la cantidad de oligosacárido molar total).

Ejemplo 2 Cultivo y Purificación

15 Se hicieron crecer 3 x 10⁵ células/ ml en frascos de 125 ml en agitación (Corning) que contenían 30 ml de medio a 37°C, con CO₂ al 5%, a 100 rpm durante 10 días. La densidad celular se midió mediante un contador CASY y se separó el sobrenadante para la determinación de la concentración de anticuerpo mediante cromatografía de afinidad a proteína A. Alrededor de 20 ml de cada sobrenadante se purificó para su posterior caracterización bioquímica mediante una cromatografía con proteína A (equilibrado con PBS, lavado con tampón de citrato sódico 25 mM a pH 5,2 y elución con tampón de citrato sódico 100 mM pH 2,8, CIP con NaOH 10 mM).

20 Ejemplo 3 Análisis de la glucoestructura de un anticuerpo

25 Se analizó el material de anticuerpos purificados mediante un análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LCMS). Las muestras se redujeron (TRIS/ HCl 0,4 M, guanidina/ HCl 8 M, pH 8,5, DTT (3 mg/ml), se carboximetilaron (ácido yodoacético) y se escindieron con tripsina. La mezcla péptido-glucopéptido se separó con RP-HPLC y se analizó en línea con espectrometría de masas por electropulverización. Los espectros m/z de la glucoestructura que contiene el péptido se integraron, y los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2
Cantidad relativa de las variantes de glucosilación

Nº clon	G0 [%]	G1 [%]	G2 [%]	Sin fuc [%]	Man ¹ [%]
1	38,4	51,4	10,2	0,1	0,5
2	44,3	47,6	8,1	0,1	0,6
3	42,8	48,7	8,5	0,2	0,8
4	49,2	43,6	7,2	0,3	1,2
5	62,7	33,0	4,3	0,6	1,0
6	60,4	35,5	4,2	0,5	1,2
7	40,4	49,8	9,8	0,3	0,6
8	46,9	45,9	7,3	0,3	1,1

30 Man: estructuras de elevada manosa con cuatro y cinco residuos manosa respectivamente.
G0, G1, G2: cadenas pesadas reducidas con un carbohidrato de tipo complejo biantenarico fucosilado con 1, 2 o 3 residuos galactosa terminal.
35 Sin fuc: cadenas pesadas reducidas con un carbohidrato de tipo complejo biantenarico fucosilado con carbohidratos de tipo complejo biantenaricos sin fucosa.

40 La línea celular CHO clon 5 (hu MAb<IGF-1R>B1-4E10_9-16) se depositó, bajo el tratado de Budapest de reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con propósito de uso en un procedimiento de patente, en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 21 de junio de 2006, con el nº de registro DSM ACC 2795.

El medio utilizado para el cultivo de los diferentes clones se obtuvo de Hyclone (HyQ SFM4 CHO-Utility, utilizado para el clon 4-6) o Sigma (C-8862, utilizado para el clon 1-3 y 7).

45 El análisis del mapa peptídico por LCMS se realizó mediante integración de los cromatogramas de iones específicos de todos los estados de carga y para todos los glucopéptidos.

Del mismo modo se determinaron la GlcNac bisectada, NGNA y elevada manosa.

50 La GlcNac bisectada y el NGNA no fueron detectables. Si la GlcNac bisectada y el NGNA no son detectables, entonces la cantidad de NGNA es del 0,5% o inferior, y también del 0,1% o inferior. La cantidad de GlcNac bisectada también es del 0,5% o inferior, y del 0,1% o inferior.

55 Un ejemplo de cálculo de glucosilación (clon 3) se muestra en la tabla 3 (Tabla 3a: clon 3, Tabla 3b: clon 5; péptido que comprende una asn298, denominado H27).

Tabla 3a

	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	% Cantidad relativa
H27_GO	616	198	0	814	28,7
H27_G1	734	425	0	1158	40,9
H27_G2	103	135	0	238	8,4
H27_G3	0	0	0	0	0,0
H27_G4	0	0	0	0	0,0
H27_G1_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_2NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_2NGNA	0	0	0	0	0,0
G0 sin GlcNAc y sin Man	0	57	0	57	2,0
G0 sin GlcNAc	330	0	0	330	11,7
G1 sin GlcNAc	208	0	0	208	7,4
Man5	22	0	0	22	0,8
G0 sin Fuc	5	0	0	5	0,2
G1 sin Fuc	0	0	0	0	0,0
Man4	0	0	0	0	0,0
Total				2833,15	100,00
Cantidad relativa de glucoestructuras con NGNA					0,0
Cantidad relativa de glucoestructuras con galactosas (G3 y G4)					0,0
Cantidad relativa de elevada manosa.....					...0,8
Cantidad relativa de G0 sin Fuc y G1 sin Fuc					0,2
Suma G0					42,4
Suma G1					48,2
Suma G2					8,4
Suma Total					99,0
En relación al 100 % de G0-1-2					
G0					42,8
G1					48,7
G2					8,5
Suma sin Man					99,2
Suma de G0/1 sin Fuc					0,2
Relative cantidad sin Fuc					0,2

Área: área del pico

- 5 H27_G0 - H27_G4: Glucopéptido H27 (que contiene Asn 298) con carbohidratos de tipo complejo biantenarios fucosilados con galactosa x-terminal (por ejemplo G4 con 4 unidades galactosa)
Cantidad relativa sin Fuc: porcentaje de Fuc en relación a la totalidad de glucoestructuras (elevada manosa) G0, G1, G2 sin manosa (4 y 5).
- 10 H27_G1_1NGNA - H27_G3_2NGNA: Glucopéptido H27 (que contiene Asn 298) con carbohidratos de tipo complejo biantenares fucosilados con unidades galactosa x-terminales (por ejemplo G2 con 2 unidades) que poseen de una a dos unidades de ácido N-glicolil-neuramínico.

Tabla 3b

Ejemplo de cálculo de glucosilación (clon 5)					
	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	Cantidad relativa [%]
G0 ¹⁾	1108	318	0	1426	43,8
G1 ¹⁾	579	319	0	897	27,6
G2 ¹⁾	67	71	0	139	4,3
G3 ¹⁾	0	0	0	0	0,0
G4 ¹⁾	0	0	0	0	0,0
G1_1 NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G2_1 NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G2_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G3_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G3_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0

Ejemplo de cálculo de glucosilación (clon 5)					
	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	Cantidad relativa [%]
G0-GlcNAc-Man ³⁾	0	95	0	95	2,9
G0-GlcNAc ³⁾	485	0	0	485	14,9
G1-GlcNAc ³⁾	159	0	0	159	4,9
Man ⁵⁾	32	0	0	32	1,0
G0-Fuc ⁵⁾	11	0	0	11	0,3
G1-Fuc ⁵⁾	9	0	0	9	0,3
Man ⁴⁾	0	0	0	0	0,0
Total				3253,88	100,00
G0					62,7
G1					33,0
G2					4,3
Glucos estructuras sin fucosa					0,6
Glucos estructuras con NGNA					0,0
Glucos estructuras con hexosas adicionales (G3+G4)					0,0
Glucos estructuras de elevada manosa					1,0
1) Glucos estructura de tipo complejo biantenario fucosilada con galactosa x-terminal (0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente) 2) Glucos estructura de tipo complejo biantenario fucosilada con galactosa x-terminal (0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente) con residuos adicionales de ácido n-glucolil neuramínico 3) Glucos estructuras de tipo complejo biantenario fucosiladas (principalmente artefactos del método) 4) Estructuras de elevada manosa con cuatro o cinco residuos de manosa respectivamente 5) Glucos estructuras no fucosiladas					

Ejemplo 4

Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos mediante HuMAb anti-IGF-IR

5 Para determinar la capacidad de los anticuerpos HuMAb generados de provocar mecanismos efectoras inmunes, se realizaron estudios de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

10 Para determinar la capacidad de los anticuerpos HuMAb generados de provocar mecanismos efectoras inmunes, se realizaron estudios de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

Para estudiar los efectos de los anticuerpos en la CCDA, se marcaron células de cáncer de próstata DU145 (HTB-81; 1 x 10⁶ en de 2 a 4 ml de RPMI-FM) que expresaban IGF-IR con 1 µl de solución de bis(acetoximetil)-2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (BATDA) durante 25 minutos a 37°C en un incubador de células. Las células se lavaron cuatro veces con 10 ml de RPMI-FM y se centrifugaron durante 10 minutos a 200 x g con freno. A continuación, se ajustó la concentración de las células a 1 x 10⁵ células por ml. Se sembraron 5.000 células por pocillo en una placa de fondo redondeado correspondiente a un volumen de 50 µl. Se añadieron los anticuerpos HuMAb a una concentración final que oscila entre 25-0,1 ng/ml en un volumen de 50 µl de medio de cultivo celular. A continuación, se añadieron 50 µl de células efectoras, PBMC recién aisladas de sangre total o células efectoras purificadas de capas leucoplaquetares, a una proporción E:T en el rango de 25:1. Las placas se centrifugaron inmediatamente durante 1 minuto a 200 x g con freno, y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 200 x g y se transfirieron 20 µl de sobrenadante a una placa microtitulada Optiplat 96-F. Se añadieron 200 µl de solución de europio (a temperatura ambiente) y la mezcla se incubó durante 15 minutos en un agitador. La fluorescencia resultante se midió en un fluorímetro de resolución temporal utilizando el protocolo EU-TDA de Perkin Elmer.

La magnitud de lisis celular mediante CCDA se expresa como un % de la liberación máxima de 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA) a partir de las células diana lisadas mediante detergente corregido con la liberación espontanea de TDA a partir de las respectivas células diana. Como estándar de referencia de un anticuerpo que no muestra CCDA se utiliza un anticuerpo (monoclonal) frente a KLH (hemocianina de lapa californiana) o una mezcla de IgG aisladas de alrededor de 35.000 donantes ("Redimune"). Como control positivo se utilizó un anticuerpo libre de fucosa en un 75% frente al IGF-IR. Un anticuerpo de acuerdo con la invención mostró una liberación de TDA que está dentro de 3xDE de la liberación de TDA del anticuerpo estándar (Fig.1).

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 o IgG3 humano que está glucosilado con una cadena de azúcares en la Asn297, y dicho anticuerpo se caracteriza porque
- 10 a) la cantidad de fucosa en dicha cadena de azúcares, en relación con la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizado mediante un análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS) es de al menos del 99%,
- 15 b) y además la cantidad de NGNA en dicha cadena de azúcares, en relación a la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizado mediante análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS), es del 1% o inferior, y/ o la cantidad de alfa 1,3-galactosa N-terminal en dicha cadena de azúcares está relacionada con la suma de G0, G1, G2 sin manosa 4 ni manosa 5, del 100%, y analizada mediante análisis del mapa peptídico por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LCMS) es del 1% o inferior.
- 20 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque la cantidad de NGNA es del 0,5% o inferior.
- 25 3. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que se caracteriza porque la cantidad de alfa 1,3-galactosa N-terminal es del 0,5% o inferior.
4. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 3, que se caracteriza porque el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano, quimérico.
5. La línea celular CHO es la DSM ACC 2795.
- 30 6. La utilización de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 4 para la fabricación de un medicamento.
7. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 4.
- 35 8. La utilización de una célula CHO de acuerdo con la reivindicación 5 para la producción recombinante de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 4.
9. Un método para la producción recombinante de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 4 en una célula CHO de acuerdo con la reivindicación 5.

Fig. 1

