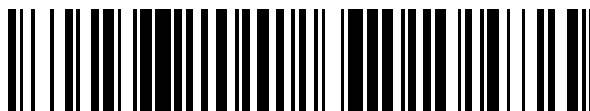


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 769**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 11163178 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2368913**

54 Título: **Anticuerpos glicomanipulados**

30 Prioridad:

**11.07.2006 EP 06450095**

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

**25.02.2015**

73 Titular/es:

**GREENOVATION BIOTECH GMBH (100.0%)  
Bötzingenstrasse 29b  
79111 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHUSTER, MANFRED;  
KIRCHEIS, RALF;  
NECHANSKY, ANDREAS;  
JOST, WOLFGANG y  
GORR, GILBERT**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 529 769 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 glicomanipulados.

5 La invención se refiere al campo de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos.

10 La industria farmacéutica crecientemente requiere sistemas de producción a gran escala alternativos rentables para producir productos biofarmacéuticos. Los sistemas de expresión basados en plantas han demostrado su utilidad como una alternativa adecuada a las fábricas de células animales. Especialmente, sus bajos costes de producción en combinación con una seguridad excepcional debido a los riesgos minimizados de contaminación por la ausencia de patógenos humanos (Raskin I. *et al.*, Trends Biotechnol. 20:522-531, 2002; Fischer R. *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol. 7:152-158, 2004) resultan de importancia vital. Las plantas son capaces de llevar a cabo la mayoría de las modificaciones postraduccionales de los eucariotas superiores (Gomord V. y Faye L., Curr. Opin. Plant Biol. 7:171-181, 2004). Entre ellas se incluyen glicosilaciones complejas, el procesamiento y plegamiento de las proteínas, así como el ensamblaje de proteínas multiméricas complejas, características que contribuyen a la bioactividad y a la farmacocinética de los anticuerpos terapéuticos activos. Por lo tanto, se han expresado con éxito diversas proteínas recombinantes, incluyendo anticuerpos humanos, en sistemas de expresión vegetales (Hiatt A. *et al.*, Nature 342:76-78, 1989; Ma J.K. *et al.*, Nat. Rev. Genet. 4:794-805, 2003).

20 Sin embargo, los oligosacáridos ligados a N derivados de plantas difieren considerablemente de los presentes en el ser humano. Aparte de la ausencia general de residuos  $\alpha$ 1,6-fucosilo en plantas, se ha demostrado que las diferencias en las modificaciones postraduccionales, tales como la glicosilación, influyen sobre las propiedades de las proteínas derivadas de plantas (Daniell *et al.*, *supra*; Conrad *et al.*, Plant Mol. Biol. 38:101-109, 1998; Mann *et al.*, Nat. Biotechnol. 21:255-261, 2003). En plantas, los glicanos ligados a N pueden contener residuos  $\beta$ (1,2)-xilosa (Xyl) antigénicos (Fayet *et al.*, Anal. Biochem. 109:104-108, 1993) y/o alergénicos (van Ree *et al.*, J. Biol. Chem. 275:11541-11458, 2000) unidos a la manosa ligada a N del núcleo glicano y residuos  $\alpha$ (1,3)-fucosa (Fuc) unidos a GlcNAc proximal que no se encuentran presentes en los glicanos de mamífero. En contraste, los residuos de ácido siálico normalmente no se encuentran unidos a los N-glicanos vegetales. Sin embargo, los anticuerpos vegetales no requieren dichos residuos para una inmunización pasiva tópica exitosa (Ma *et al.*, *supra*).

30 El procesamiento mediante glicosilación en el retículo endoplasmático (RE) se encuentra conservado en todas las especies y se restringe a los N-glicanos de tipo oligomanosa ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ), mientras que el procesamiento generado en el Golgi en glicanos híbridos y de tipo complejo es altamente diverso (Helenius *et al.*, Science 291:2364-2369, 2001). La retención en el RE de las proteínas expresadas en las plantas transgénicas habitualmente mejora los niveles de producción (Conrad *et al.*, Plant Mol. Biol. 38:101-109, 1998; Sharp *et al.*, Biotechnol. Bioen. 73:338-346, 2001). Sin embargo, debido a que el procesamiento de los glicanos puede afectar a la estabilidad de los anticuerpos (Rudd *et al.*, Science 291:2370-2376, 2001), no está claro si un anticuerpo derivado de sistemas de expresión vegetales con estructuras de glicano modificadas se encontraría activo y podría proporcionar una profilaxis sistema efectiva tras la exposición.

40 Como plataforma de producción compatible a gran escala para proteínas recombinantes en cultivos en suspensión contenidos, el robusto musgo *Physcomitrella patens* ofrece una tecnología de producción absolutamente libre de componentes animales de última generación mediante la combinación de varios atributos beneficiosos con una tasa extraordinariamente elevada (no sólo entre plantas terrestres) de recombinación homóloga de ADN nuclear, permitiendo una inactivación dirigida eficiente de genes (Gorr G. y Wagner S., Modern Biopharmaceuticals 3:919-929, 2005; Girke T. *et al.*, Plant J. 15:39-48, 1998; Schaefer D.G. y Zyrd J.P., Plant J. 11:1195-1206, 1997). En los intentos de "humanizar" las estructuras oligosacáridas ligadas a N, recientemente se han generado variantes de doble inactivación para los genes de  $\beta$ 1,2-xilosiltransferasa y de  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa ( $\Delta\text{xyl-t}/\Delta\text{fuc-t}$ ) según el documento WO 04/057002. Las variantes del musgo sintetizan glucoproteínas totales que no presentan en absoluto los dos residuos sacáridos específicamente vegetales, y sin embargo no resultaron afectadas en morfología, crecimiento, desarrollo y capacidad de secretar glucoproteínas recombinantes (Koprivova A. *et al.*, Plant Biotechnology J. 2:517-523, 2004; Huether C.M. *et al.*, Plant Biol. 7:292-299, 2005). También se ha demostrado la unión con éxito de galactosa terminal de tipo humano ligada en 1,4, a N-glicanos de musgo (Huether C.M. *et al.*, Plant Biol. 7:292-299, 2005; Gorr y Jost, Bioprocess J. 4:26-30, 2005). Las características funcionales de los anticuerpos, tales como las actividades ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) no se dan a conocer en dichas referencias.

50 Aunque se han realizado esfuerzos para producir anticuerpos con sistemas de expresión vegetales, se ha descrito estabilidad de los anticuerpos debido a la modificación de los patrones de glicosilación y efectos negativos sobre la función efectora y la interacción entre regiones Fc y receptores de Fc de estos anticuerpos. Se ha informado de que las funciones mediadas por la parte Fc de las inmunoglobulinas se encuentran fuertemente relacionadas con sus estructuras oligosacáridas ligadas a N (Jefferis R. *et al.*, Immunol. Rev. 163:59-76, 1998).

60 En particular los oligosacáridos fucosilados nucleares han demostrado una unión más débil al receptor Fc $\gamma$ R111 (CD16) expresado sobre las células efectoras y resultan en un potencial lítico reducido (Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Shinkawa T. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:3466-3473, 2003). En contraste, los

anticuerpos producidos por levaduras que no presentan fucosa nuclear en su patrón de N-glicanos mostraron un potencial débil en un ensayo de reducción de células B. Sólo las concentraciones elevadas del anticuerpo resultaron en una reducción de las células B de un donante sano. No se dan a conocer en dichas referencias las características de los anticuerpos, tales como las actividades ADCC y CDC.

5 Sin embargo, tras la producción del anticuerpo *in vivo* la mayoría de las estructuras de N-glicano presentadas en el presente estudio fueron procesadas *in vitro* en etapas adicionales mediante la utilización de enzimas específicos para conseguir los patrones de N-glicanos finales (Li *et al.*, Nat. Biotechnol., doi: 10.1038/nbt1178, 2006).

10 La patente US nº 6.602.684 describe procedimientos para incrementar la función efectora de un anticuerpo mediante la modificación de estructuras de glicano complejas, tales como estructuras de glicano N-ligadas bisectadas modificadas por GnTIII.

15 Los anticuerpos monoclonales contra la rabia se han descrito en el documento WO 2005/000225 A2. Estos anticuerpos son de las clases IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, son producidos en plantas, no presentan estructuras de N-glicano con residuos  $\alpha$ -1,3-fucosa y presentan menos epítopos vegetales alergénicos.

20 El documento WO 2004/050838 A2 describe inmunoglobulinas contra el virus del herpes simplex producido en plantas sin residuos fucosa pero puede comprender xilosa.

La exposición del documento WO 01/31045 A1 se refiere a un procedimiento para producir proteínas con glicoestructuras de tipo mamífero en plantas. Preferentemente las plantas no presentan una fucosiltransferasa o xilosiltransferasa activa.

25 El documento US 2006/0034829 A1 describe inmunoglobulinas con una estructura de N-glicano de fórmula  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

El documento US 2006/0029604 A1 describe inmunoglobulinas con una estructura de N-glicano de fórmula  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Estas estructuras son generadas mediante tratamiento con  $\beta$ -galactosidasa.

30 El documento WO 01/55434 A1 se refiere a la inhibición de los enzimas modificadores de carbohidratos en plantas, en particular GBSS y GnTI.

35 Sriraman *et al.*, Plant Biotechnology Journal 2:279-287, 2004, dan a conocer una comparación entre dos anticuerpos diferentes, en la que uno de los anticuerpos presenta la secuencia KDEL en el extremo C-terminal. El anticuerpo con la secuencia KDEL se glicosiló con oligosacáridos de tipo rico en manosa.

El documento EP 0 361 902 A se refiere a un procedimiento para la homogeneización de preparaciones de anticuerpos mediante la eliminación de los aminoácidos C-terminales de las cadenas pesadas.

40 Harris *et al.*, Journal of Chromatography 705:129-134, 1995, presentan estudios para la modificación postraduccional de proteínas en cultivos de células de mamífero.

45 Huether *et al.*, Plant Biology 7:292-299, 2005, describen un sistema vegetal en el que tanto la  $\alpha$ (1,3)-fucosiltransferasa como la  $\beta$ (1,2)-xilosiltransferasa han sido desactivadas con el fin de formar glicoestructuras humanizadas.

Incluso en vista de la larga y exhaustiva investigación sobre el desarrollo de anticuerpos, todavía existe una elevada demanda de anticuerpos con características mejoradas tales como funciones efectoras incrementadas.

50 El objetivo de la invención es proporcionar anticuerpos con propiedades mejoradas.

Según la invención, dicho objetivo se consigue a partir de la materia objeto de las reivindicaciones.

55 La presente invención proporciona una preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos modificados de un animal, preferentemente un mamífero, o de derivados o fragmentos de los mismos, que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina y una región Fc, específica para un antígeno, caracterizada por que:

- 60
- los anticuerpos o derivados o fragmentos de los mismos comprende una estructura de N-glicano sin fucosa ni xilosa, seleccionada de entre  $\text{GlcNC}_2\text{Man}_3$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$  o  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , y
  - por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, más preferentemente por lo menos 99%, todavía más preferentemente 100% de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos no presenta un residuo lisina C-terminal. La actividad de ADCC de la preparación puede ser además por lo
- 65 menos 10% menos inhibida en una disolución de suero de por lo menos 10% (siendo 100% suero sin diluir)

que comprende anticuerpos inespecíficos del animal que una preparación de anticuerpo no modificada del animal específica para el mismo antígeno.

Se ha descubierto que la función efectora de los anticuerpos terapéuticos resulta generalmente inhibida por el nivel de fondo normal de anticuerpos presente normalmente en los líquidos corporales. A las concentraciones séricas elevadas naturales de IgG terapéutico (por ejemplo IgG1 ó IgG3 humana o IgG2a murina) resultan necesarios anticuerpos para compensar la inhibición de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por el exceso de inmunoglobulina G endógena. El suero humano presenta una concentración de anticuerpos media de aproximadamente 11,7 mg/ml, en la que IgG1 e IgG3 constituyen la mayoría (conjuntamente 7,7 mg/ml). Los niveles séricos normales de IgG bloquean la unión de un anticuerpo IgG terapéutico al receptor de IgG de baja afinidad (FcγRIIIa, CD16), el cual se encuentra presente sobre las células NK. Conjuntamente con CD64, estos dos receptores de Fcγ son los receptores celulares principales que median en la ADCC. La lisis de ADCC puede incrementarse mediante diferentes estructuras de glicosilación (ver, por ejemplo, el documento WO 2006/005367). Sin embargo, estos anticuerpos todavía podrían ser inhibidos por anticuerpos séricos inespecíficos (Preitner *et al.*, Mol. Immunol. 43:1183-1193, 2003). Ahora inesperadamente se ha descubierto que una preparación de anticuerpos con una estructura de N-glicano sin fucosa y xilosa, en particular sin la lisina C-terminal, preferentemente también sin galactosa, es crecientemente resistente a esta inhibición en un grado significativo.

La referencia a la preparación de anticuerpos no modificada del animal, en particular un mamífero, específico para el mismo antígeno, debe entenderse haciendo referencia a que con el anticuerpo según la presente invención resulta modificada la función efectora de la parte C-terminal del anticuerpo. Evidentemente la actividad lítica (ADCC) también es dependiente de la afinidad del anticuerpo para su diana respecto a la que la función efectora lítica mediada por la parte Fc debe considerarse que es independiente. El anticuerpo no modificado normalmente comprende una estructura de N-glicano con galactosa, fucosa (especialmente  $\alpha$ 1,3-fucosa) y/o xilosa (especialmente  $\beta$ 1,2-xilosa). Preferentemente, tanto el anticuerpo modificado de la invención y el anticuerpo no modificado (es decir parental) son anticuerpos monoclonales y más preferentemente de expresión recombinante (o diseñados para la expresión recombinante) en sistemas de expresión celulares, por ejemplo de células vegetales.

Alternativamente a una solución de suero comparativa (que puede, por ejemplo, diluirse a aproximadamente 10% de suero) puede utilizarse una composición de anticuerpos no específicos. Dicha composición de anticuerpos comparativa puede presentar anticuerpos fisiológicos de un animal o puede ser una preparación de anticuerpos parentales (no modificados) del anticuerpo de la invención (modificado). Los anticuerpos comparativos pueden encontrarse a concentraciones similares a las de los anticuerpos séricos, por ejemplo 0,5 a 15 mg/ml, preferentemente 1 a 5 mg/ml, más preferentemente 3 mg/ml. Preferentemente, los anticuerpos comparativos son IgG1 e IgG3. Dados los niveles séricos aproximados de IgG1 e IgG3 en el suero de 7,7 mg/ml, 10% de suero resultaría en 0,77 mg/ml y 40% de suero en 3,08 mg/ml de IgG1 e IgG3.

Pueden producirse anticuerpos nuevos que presenten dicha resistencia, así como derivados, fragmentos o una preparación de los mismos, en células vegetales recombinantes, siendo deficientes en  $\beta$ 1,2-xilosiltransferasa y  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa.

Preferentemente, las estructuras de N-glicano de los anticuerpos o derivados o fragmentos de los mismos también se encuentran libres de galactosa. La falta de galactosa puede conseguirse mediante la expresión en un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema específico de expresión de células vegetales, o mediante el tratamiento con galactosidasa o mediante la expresión en células, las cuales no presenten actividad de 1,4-galactosiltransferasa.

Preferentemente, la preparación de anticuerpos no modificados presenta la misma afinidad para el antígeno que la preparación de anticuerpos modificados o derivados o fragmentos de los mismos.

En la preparación, preferentemente por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, más preferentemente por lo menos 99%, todavía más preferentemente 100% de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos no presentan un residuo lisina C-terminal, en particular determinado en la suma de las cadenas pesadas (que normalmente pueden comprender lisina). Debido a que los anticuerpos pueden presentar más cadenas que potencialmente comprendan la lisina C-terminal, se entiende que el porcentaje cuantitativo de falta de lisina se refiere a todas las cadenas que potencialmente presentan la lisina C-terminal. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales son heterogéneos respecto a la presencia de la lisina C-terminal (Lazar *et al.*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 18(3):239-244, 2004). Inesperadamente se ha encontrado que los anticuerpos con eliminación cuantitativa (o falta de expresión cuantitativa) de lisina C-terminal presentan funciones efectoras significativamente ventajosas respecto a otros anticuerpos. En la presente memoria se ha demostrado que la ADCC puede resultar inhibida en diluciones de suero por los anticuerpos fisiológicos presentes. Este efecto de inhibición no se encontraba presente (o era significativamente menor) en los anticuerpos de la invención de la presente forma de realización que no presentaban lisina C-terminal.

Además, la estructura N-glicano de los anticuerpos o derivados o fragmentos de los mismos preferentemente se selecciona de entre GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc o GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Preferentemente, la estructura GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> comprende por lo menos 50% de los anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos,

más preferentemente por lo menos 70% o más preferentemente por lo menos 90%. En otras formas de realización, las estructuras preferentes son GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> y/o GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc, en particular en las que las estructuras GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> y GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc se encuentran presentes en por lo menos 30%, preferentemente en por lo menos 50%, más preferentemente en por lo menos 70% de las estructuras de N-glicano de los anticuerpos modificados o derivados o fragmentos de los mismos.

En formas de realización especiales de la preparación del anticuerpo, menos de 50%, preferentemente menos de 30%, más preferentemente menos de 10% de los anticuerpos, derivados o fragmentos de los mismos no presentan la estructura de N-glicano. La estructura de N-glicano, que se encuentra unida a Asn<sub>297</sub> en los anticuerpos IgG humanos preferentemente se encuentra presente en la mayoría de anticuerpos de la preparación.

El animal del que se derivan los anticuerpos modificados (así como sus fragmentos y derivados) preferentemente es un mamífero, en formas de realización particulares, un ser humano o un ratón, o un reptil, en formas de realización particulares un cocodrilo, aunque los anticuerpos pueden expresarse recombinantemente en otros organismos, tales como células vegetales.

Preferentemente, la actividad de ADCC de la preparación resulta por lo menos un 10% menos inhibida, con especial preferencia por lo menos 15%, 20%, 25% o incluso 30%, en una solución de por lo menos 10% de suero, preferentemente de por lo menos 40% de suero, que comprende anticuerpos no específicos del animal, en comparación con una preparación de anticuerpos no modificados del animal específicos para el mismo antígeno. Los nuevos anticuerpos presentan esta resistencia excepcional al enmascaramiento de efectos de otros anticuerpos presentes en los líquidos corporales (por ejemplo en el suero) del animal. Preferentemente la actividad de ADCC de la preparación es por lo menos 20%, preferentemente por lo menos 30%, menos inhibida en la solución de anticuerpos no específicos.

Entre las formas preferidas de los anticuerpos se encuentran anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos, preferentemente anticuerpos IgG.

En una forma de realización especial de la invención una característica preferente de la preparación de anticuerpos es que la actividad de CDC es por lo menos 10% menor que la de una preparación de anticuerpos no modificados específicos para el mismo antígeno. En otra forma de realización, la preparación presenta una actividad de ADCC incrementada por lo menos 10 veces en comparación con una preparación de anticuerpos no modificados del animal específicos para el mismo antígeno.

En formas de realización específicas, la unión de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos a CD16<sub>158 F/F</sub> resulta por lo menos 10% menos inhibida en una solución de por lo menos 10% de suero, preferentemente de por lo menos 40% de suero, que comprende anticuerpos no específicos del animal en comparación con una preparación de anticuerpos no modificados del animal específicos para el mismo antígeno.

Preferentemente la lisis celular de dianas de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos mediada por células efectoras de genotipo CD16<sub>158</sub> resulta 10% menos inhibida en una solución de por lo menos 10% de suero, preferentemente de por lo menos 40% de suero, que comprende anticuerpos no específicos del animal, en comparación con una preparación de anticuerpos no modificada del animal específica para el mismo antígeno.

También se describe una preparación de anticuerpos obtenible mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo, un fragmento o un derivado de los mismos en células, preferentemente en células vegetales, siendo deficientes en actividades de β1,2-xilosiltransferasa y α1,3-fucosiltransferasa. Dicha preparación de anticuerpos preferentemente se caracteriza adicionalmente por las ventajas funcionales y estructurales anteriormente indicadas. Se entiende que un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo puede comprender más de una cadena de aminoácidos y puede resultar necesario más de un ácido nucleico (por ejemplo uno por cada cadena) para la expresión. Evidentemente más de una cadena puede encontrarse codificada por un ácido nucleico, por ejemplo en un vector.

Preferentemente, la preparación de anticuerpos es obtenible en células que también son deficientes en galactosiltransferasa, preferentemente las células no presentan en absoluto galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa o ninguna galactosiltransferasa.

En formas de realización especiales, la preparación de anticuerpos es obtenible en sistemas de expresión que permiten unir residuos de galactosa en enlace 1,4 a los residuos terminales de GlcNAc de los N-glicanos. Dichos sistemas de expresión pueden comprender una actividad de galactosiltransferasa natural o pueden manipularse genéticamente para conseguir la actividad de galactosiltransferasa específica.

Preferentemente, la preparación de anticuerpos se expresa en células con actividad de GnTIII, especialmente tal como se da a conocer en la patente US nº 6.602.684 o en el documento WO 99/54342. La actividad de GnTIII conduce a funciones efectoras líticas adicionalmente mejoradas (por ejemplo la introducción de estructuras

bisectadas). Las células se encuentran transfectadas, por ejemplo, con un gen GnTIII que resulta en una expresión de GnTIII incrementada en comparación con las células no transfectadas o no modificadas.

También se divulga un anticuerpo modificado o derivado o fragmento del mismo, en el que la estructura de glicano de dicho anticuerpo no presenta fucosa y xilosa, preferentemente tampoco presenta galactosa, y la estructura de N-glicano es  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$  o  $\text{Glc-NAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$  o  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . La estructura de N-glicano preferentemente presenta la fórmula  $\beta$ -1,4-GlcNAc- $\beta$ -1,4-GlcNAc-( $\beta$ -1,4-Man)( $\alpha$ -1,6-Man)( $\alpha$ -1,3-Man), en la que un (o ambos) residuos de  $\alpha$ -manosa pueden unirse a un  $\beta$ -1,4-GlcNAc adicional (fig. 4). La glicosilación nuclear generalmente se observa en Asn297 en los anticuerpos IgG.

En un aspecto particular la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o derivado o fragmento del mismo que reconoce el antígeno Lewis Y y se deriva de un anticuerpo monoclonal parental (es decir, el anticuerpo no modificado) que reconoce el antígeno Lewis Y y que comprende galactosa, fucosa o xilosa, en el que la estructura de glicano de dicho anticuerpo monoclonal no presenta fucosa ni xilosa, preferentemente tampoco presenta galactosa, la función efectora de ADCC es por lo menos 10 veces mayor y la especificidad de unión a antígeno y la afinidad de dicho anticuerpo son idénticas o similares a las del anticuerpo parental no modificado. Para esta realización puede utilizarse como anticuerpo parental cualquier anticuerpo que reconozca Lewis-Y.

Un anticuerpo monoclonal parental preferente es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera humanizada, una región constante de cadena ligera humana, una región variable de cadena pesada humanizada y una región constante de cadena pesada humana, en el que la región variable de cadena ligera humanizada puede presentar por lo menos partes de la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 1 y la región variable de cadena pesada humanizada puede presentar por lo menos partes de la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 2. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la invención es idéntica a la del anticuerpo parental. Por ejemplo, el derivado de anticuerpo puede ser uno quimérico según el documento EP 0 528 767. En formas de realización especiales, el derivado de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla (ACS). Los ACS se dan a conocer, por ejemplo, en la patente US nº 4.946.778. En comparación con el anticuerpo parental no modificado, que se encuentra codificado por el mismo ADN pero se expresa en un huésped animal, por ejemplo un mamífero, el anticuerpo según la invención puede mostrar un ensamblaje, plegamiento, especificidad y bivalencia idénticas o similares y preferentemente no muestra un grado más elevado de degradación o de agregación.

El derivado de anticuerpo puede seleccionarse de entre el grupo de anticuerpos recombinantes o artificiales, incluyendo los anticuerpos de cadena sencilla, en particular anticuerpos humanizados de un animal. En particular, los anticuerpos de camellos o reptiles tales como cocodrilos resultan preferentes, los cuales son mínimamente antigénicos en seres humanos. Los fragmentos de anticuerpo pueden comprender o seleccionarse de entre las partes constantes y/o variables de un anticuerpo en particular seleccionado de entre Fc, de tipo Fc, Fv, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scfc y V<sub>HH</sub>. Más preferentemente el fragmento de anticuerpo es un fragmento de tipo Fc o un fragmento Fc con la estructura de glicosilación de la invención.

La eficacia clínica del anticuerpo parental se relaciona con la actividad biológica de la parte Fc de la molécula de IgG1 humana, la cual está determinada por su eficiencia en la inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La función de ADCC depende de la glicosilación de la parte Fc, que interactúa con FcγRIII sobre los granulocitos y los monocitos (Lifely *et al.*, *Glycobiology* 5(8):813-822, 1995).

La función efectora de ADCC del anticuerpo y/o de la preparación según la invención es por lo menos 5 veces más alta, preferentemente por lo menos 10 veces, más preferentemente por lo menos 20 veces o incluso por lo menos 30 veces más alta, todavía más preferentemente por lo menos 40 veces más alta, todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta que la actividad de ADCC del anticuerpo parental, es decir, en comparación con la preparación de anticuerpos no modificada específica para el mismo antígeno. La función efectora de ADCC se determina mejor mediante la lisis celular de células que expresan el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo (valor de EC<sub>50</sub> de la lisis). Como antígeno se entiende un compuesto contra el que pueden dirigirse generalmente anticuerpos (por ejemplo cualquier proteína, glucoproteína, ácido nucleico, etc.). El antígeno puede presentar un epítipo o alternativamente más de un epítipo. Preferentemente los anticuerpos se dirigen contra el mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales.

La actividad de lisis de ADCC del anticuerpo de la invención puede medirse en comparación con el anticuerpo parental utilizando células con antígenos diana en ensayos de lisis celular. En los casos de anticuerpos dirigidos contra el antígeno Lewis-Y, pueden utilizarse como dianas líneas celulares de cáncer positivas para Lewis-Y, por ejemplo SKBR5, SKBR3, LoVo, MCF7, OVCAR3 y Kato III.

La lisis de células tumorales mediada por células efectoras puede depender fuertemente de la interacción entre los dominios Fc de inmunoglobulina y los receptores de Fc sobre las células efectoras. El receptor CD16 expresado sobre las células NK se ha informado de que se une, dependiendo de su fenotipo, con diferentes afinidades a IgG (Niwa *et al.*, *Cancer Res.* 64:2127-2133). Por lo tanto, se analizó el genotipo CD16 de los donantes de PBMC y se encontró que sólo aproximadamente 50% (5 de 10) expresaba el fenotipo de alta afinidad (CD16<sub>158V/V</sub>). Los análisis de ADCC llevado a cabo con dichos donantes de PBMC mostraron una actividad lítica fuertemente incrementada

con preparaciones de anticuerpos parentales y el anticuerpo según la invención, en comparación con células NK que expresan el receptor de baja afinidad (CD16<sub>158F/F</sub>). La comparación lado a lado sobre las células Ovar-3 reveló un incremento del potencial lítico del anticuerpo según la invención de un factor de aproximadamente 40, independientemente del fenotipo de CD16 seleccionado.

El anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo murino, quimérico, humano o humanizado, preferentemente el anticuerpo es uno humanizado. En una realización preferida, el anticuerpo es IgG o un fragmento o derivado del mismo, preferentemente IgG1 o un fragmento o derivado del mismo. En una realización adicional, el presente anticuerpo de la invención es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de la IgG humana.

Así, en un aspecto la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica que contiene el anticuerpo según la invención en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de dicho anticuerpo como producto farmacéutico.

El producto farmacéutico puede utilizarse como medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico para la reducción o inhibición, respectivamente, del crecimiento de células tumorales en un paciente, especialmente para el tratamiento del cáncer sólido, por ejemplo para el tratamiento de tumores metastatizados o células tumorales diseminadas de origen epitelial. Además, el anticuerpo según la invención puede utilizarse para el tratamiento de una enfermedad residual mínima.

El anticuerpo según la invención a una concentración dada fue capaz de lisar células diana en un abanico más amplio de densidades de antígeno. Este fenómeno puede resultar relevante en la terapia tumoral, especialmente debido a que las densidades del antígeno diana no pueden considerarse constantes sobre los tumores epiteliales y pueden variar tanto en los tumores primarios como en las metástasis derivadas. En resumen, los anticuerpos terapéuticos activos expresados por cepas de producción glico-optimizadas (tal como el anticuerpo IGN314 producido por un musgo) muestran una actividad lítica incrementada y podrían reducir las dosis terapéuticas o, a una concentración dada, lisar un espectro más amplio de células tumorales con diferentes densidades de antígenos. Especialmente las células con bajas densidades de antígenos, que escaparían a los anticuerpos terapéuticos estándares pero que podrían ser la diana y resultar destruidos por dichos anticuerpos glicomanipulados. Además de lo anterior, los anticuerpos glico-optimizados mostraron valores de EC<sub>50</sub> más bajos en todas las líneas celulares investigadas y en ambos fenotipos de CD16<sub>158</sub>, lo que es indicativo de una afinidad más alta para tanto el fenotipo CD16<sub>158F/F</sub> como CD16<sub>158V/V</sub>. Esta fuerte interacción reduce las concentraciones EC<sub>50</sub> y permite una reducción de la concentración umbral necesaria para iniciar la lisis de las células diana para ambos fenotipos. Este fenómeno puede reportar un beneficio terapéutico especialmente para pacientes con el fenotipo de baja afinidad, que de otra manera requeriría concentraciones de anticuerpos más altas para obtener el mismo efecto terapéutico al tratarlo con preparaciones de anticuerpos clásicas.

En otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para la fabricación de una preparación de anticuerpos como se ha definido anteriormente, en el que el anticuerpo se expresa en células, preferentemente células vegetales, siendo deficiente en actividad de β1,2-xilosiltransferasa y de α1,3-fucosiltransferasa, preferentemente careciendo completamente de actividades de β1,2-xilosiltransferasa y de α1,3-fucosiltransferasa, así como el anticuerpo que puede obtenerse mediante esta expresión. Por ejemplo, puede utilizarse por lo menos un vector que comprende ácidos nucleicos codificantes de cadenas de anticuerpo, para transformar una célula o célula vegetal que, a su vez, puede multiplicarse y utilizarse para producir el anticuerpo modificado.

Preferentemente, las células también son deficientes en actividad de 1,4-galactosiltransferasa.

En las formas de realización preferidas el ADN codificante de los anticuerpos, fragmentos o derivados utilizados para expresar los anticuerpos, fragmentos o derivados carece del codón para la lisina C-terminal.

En otras formas de realización, la lisina C-terminal de los anticuerpos, fragmentos o derivados se elimina, preferentemente con una carboxipeptidasa, por ejemplo la carboxipeptidasa B, o *in vivo* mediante la selección de las condiciones de cultivo celular apropiadas, preferentemente mediante la selección de sistemas de expresión de células animales. La expresión se realiza preferentemente en células BY2, células de zanahoria, levaduras (por ejemplo *Pichia* o *Saccharomyces*), ciliados, algas o células de insecto.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1: secuencias de la región variable de cadena ligera humanizada del anticuerpo monoclonal IGN314 con diana en Lewis Y.

Fig. 2: secuencia de la región variable de cadena pesada humanizada del anticuerpo monoclonal IGN34 con diana en Lewis Y. Puede utilizarse la secuencia 1 ó 2.

Fig. 3: caracterización del anticuerpo purificado IGN314

(a) Geles de SDS-poliacrilamida teñidos con planta de IGN314 purificado en comparación el anticuerpo parental IGN311. El IGN311 es un anticuerpo IgG anti-Lewis Y monoclonal humanizado. Bajo condiciones no reductoras (panel izquierdo), ambas muestras mostraron exactamente las mismas bandas de proteínas en el rango de aproximadamente 150 kDa, correspondiente al peso molecular esperado de IgG correctamente ensamblada correcta. (-) Sobrenadante de cultivo de falsas transformaciones purificado simultáneamente. Bajo condiciones reductoras (panel derecho), sólo pudieron detectarse bandas de proteínas de aproximadamente 50 y 25 kDa, correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de IgG, respectivamente.

(b) Análisis de HPLC de exclusión por tamaño de IGN314. El producto de expresión eluyó como un pico agudo en un tiempo de retención de 8,6 minutos, característico de IgG intacta. Aparecieron picos no totalmente resueltos y menos abundantes (menos de 10%) de 7,4 y 7,9 minutos, que probablemente podrían corresponder a una cantidad menor de estructuras agregadas de anticuerpos, tales como multímeros de IgG. (c) Verificación de la especificidad de IGN314 mediante el ensayo de su actividad de unión a antígeno en un ELISA sándwich anti-idiotípico (prueba de Runs). Las curvas de dilución se muestran gráficamente en comparación con IGN311. Las curvas se ajustaron utilizando un ajuste sigmoide de cuatro parámetros (bondad de ajuste:  $R^2 > 0,99$ ).

Fig. 4: N-glicosilación de IGN311 e IGN314

Se proporciona una tabla de las estructuras de glicano deducidas a partir de los espectros de masas respectivos. Se separaron los péptidos digeridos con tripsina obtenidos de las bandas de gel de SDS-poliacrilamida de las cadenas pesadas de los anticuerpos IGN311 (parental) e IGN314 (glicomodificado) mediante HPLC y se analizaron mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización. Se calcularon las masas de los glicanos en relación a las masas detectadas de los glucopéptidos de la secuencia TKPREEQYN<sup>297</sup> STYR (con un sitio de corte de tripsina no utilizado) o EEQYN<sup>297</sup> STYR. Las estructuras de glicano se dedujeron a partir del incremento de masa respectivo. GlcNAc=N-acetilglicosamina; Man=manosa; Fuc=fucosa ligada en 1,6, y Gal=residuos de galactosa ligada en 1,4. El residuo GlcNAc puede unirse a cualquiera de las dos antenas. El residuo Gal puede unirse a cualquiera de las dos antenas. El residuo Fuc se une al residuo GlcNAc proximal.

Fig. 5: estructura de IgG1-Fc humana e interacción con FcγRIII (CD16). Panel A: estructura general de un anticuerpo IgG. El anticuerpo IgG2a murino fue cristalizado por Harris *et al.* (banco de datos de proteínas Brookhaven, código 1IGT). Las dos cadenas pesadas se muestran en azul oscuro y azul pálido, respectivamente. En rojo, se indican los dominios carbohidratos unidos a Asn297 de las cadenas pesadas. Panel B: interacción de IgG1-Fc humano con FcγRIII (CD16). El complejo fue cristalizado y publicado en banco de datos de proteínas Brookhaven, código 1T89). Se muestra un modelo de cinta de Fc humano (consistente de CH1 y CH2) con los dos componentes cadena pesada en azul pálido y violeta, respectivamente. La región extracelular de CD16, unida a la superficie celular (caja gris), se muestra en verde. La línea discontinua indica que CD16 existe como molécula competente para la señalización o como molécula unida a GPI (no competente para la señalización). La localización del residuo fucosa que no se encuentra presente en la variante glicomanipulada IGN311 se encuentra rodeada por un círculo (naranja).

Fig. 6: comparación entre la lisis mediada por ADCC de las células tumorales por las PBMC humanas mediada por el anticuerpo parental IGN311 (línea gris) y variante defucosilada derivada musgo IGN314 (línea negra): efecto de suero humano sobre la lisis celular mediada por anticuerpos (ADCC) en diferentes matrices de suero. Las muestras se diluyeron con RPMI 1640 en matriz constante (FCS al 10% o NHS al 40%, respectivamente) y se midió la lisis mediada por ADCC de células tumorales SK-BR-3 por PBMC humanas por triplicado. Los datos se ajustaron utilizando un ajuste sigmoide de cuatro parámetros (bondad de ajuste,  $R^2 > 0,92$  para todos los casos). Se evaluó el potencial de lisis a  $EC_{50}$ : 0,301  $\mu$ g/ml (IC al 95%: 0,169-0,537) y 0,052  $\mu$ g/ml (IC al 95%: 0,028-0,094) para IGN311 parental de tipo salvaje e IGN314 glicomanipulado, respectivamente, en FCS al 10% y 1,558  $\mu$ g/ml (IC al 95%: 0,989-2,457) y 0,126  $\mu$ g/ml (IC al 95%: 0,065-0,244) para IGN311 parental e IGN314 glicomodificado, respectivamente, en NHS al 40%.

Fig. 7: (A) cromatografía C18 del péptido C-terminal de anticuerpo SLSLSPG de IGN311, IGN314 e IgG policlonal humano. (B) Cromatografía C18 del péptido C-terminal de anticuerpo SLSLSPGK de IGN311; SLSLSPGK no fue detectado en el IGN314 de la muestra ni en la IgG policlonal humano.

### Descripción detallada de la invención

Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se indique lo contrario.

El término anticuerpo incluye anticuerpos o derivados de anticuerpo o fragmentos de los mismos y las especificaciones de los anticuerpos también se aplican a la preparación de anticuerpos de la presente invención. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen equivalentes funcionales u homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina o péptidos que imiten este dominio de unión conjuntamente con una región Fc o una región homóloga a una región Fc o por lo menos parte de ella. Se



encuentran incluidas las moléculas químéricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalentes, fusionados con otro polipéptido.

5 Son moléculas de anticuerpo ejemplificativas las moléculas de inmunoglobulina intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contengan el paratopo, incluyendo aquellas partes conocidas como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y F(v), así como la estructura de N-glicano.

10 Inesperadamente se ha descubierto que, en una realización de la invención, el anticuerpo según la invención puede presentar una farmacocinética mejorada. La falta de residuos de galactosa terminales en la molécula de anticuerpo puede reducir la incorporación no deseable de dichas moléculas de anticuerpo por parte de células del sistema endotelial reticular (como células de Kupffer en el hígado) y también la incorporación mediante asialoglicorreceptores en las células hepáticas. Lo anterior puede resultar en menos efectos secundarios no deseados y una farmacocinética mejorada, así como una vida media incrementada del anticuerpo, resultando en una concentración eficiente prolongada y una función efectora más duradera del anticuerpo circulante hacia las células diana expresantes de antígeno (por ejemplo Lewis-Y, CD20, Ep-CAM, HER-2, receptor Erb1, receptor Erb2)

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el anticuerpo según la invención puede ser expresado en las células huésped, cubriendo cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse para expresar el anticuerpo. Comprendido dentro del alcance de la invención, el término "células" se refiere al cultivo de células individuales, tejidos, órganos, células de insecto, células de ave, células de reptil, células de mamífero, células de hibridoma, células primarias, líneas celulares continuas, células madre y/o células genéticamente manipuladas, tales como células recombinantes que expresan un anticuerpo glicosilado según la invención.

25 Los sistemas celulares utilizados para la expresión recombinante del anticuerpo según la invención pueden ser cualquier célula, tejido, organismo del reino animal, por ejemplo cabras transgénicas, células CHO, células de insecto y líneas celulares humanas.

30 Preferentemente, las células son células animales, por ejemplo células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, célula CHO, células COS, células murinas, células humanas, células HeLa, células 293, células VERO, células MDBK, células MDCK, células MDOK, células CRFK, células RAF, células TCMK, células LLC-PK, células PK15, células WI-38, células MRC-5, células T-FLY, células BHK, células SP2/0, células NS0 o derivados de las mismas.

35 Alternativamente, la célula, tejido u organismo también puede ser del reino de los hongos o del reino vegetal, por ejemplo levadura, tabaco, arroz, alfalfa o maíz. Alternativamente, pueden seleccionarse células de briófitos, por ejemplo de especies de los géneros *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*, *Ceratodon*, *Marchantia* y *Sphaerocarpos*. Resulta ejemplificativa la célula de briófito *Physcomitrella patens*, tal como se utiliza en el documento WO 04/057002.

40 Alternativamente, puede utilizarse un sistema de expresión que presente una fucosiltransferasa nuclear disfuncional o que no presente y/o una xilosiltransferasa disfuncional o que no presente, y/o una 1,4-galactosiltransferasa disfuncional o que no presente.

45 La galactosa, fucosa y/o xilosa alternativamente pueden eliminarse del anticuerpo según la presente invención mediante tratamiento con enzimas que eliminen los residuos. Puede utilizarse cualquier enzima que resulte en la liberación de los residuos de galactosa, fucosa y/o xilosa de los N-glicanos, de entre los conocidos en la técnica, por ejemplo  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -fucosidasa.

50 Alternativamente, puede utilizarse un sistema de expresión que sinteticé N-glicanos modificados que no pueden ser utilizados como sustratos por la 1,3-fucosiltransferasa y/o la 1,2-xilosiltransferasa y/o la 1,4-galactosiltransferasa.

Alternativamente, puede utilizarse un sistema de expresión que coexpresé las carboxipeptidasas básicas responsables del corte de los residuos de lisina C-terminales, resultando en una velocidad de corte mejorada.

55 Alternativamente, se utiliza un sistema de expresión que comprende carboxipeptidasas básicas dirigidas para la localización óptima con el fin de conseguir un corte mejorado de los residuos de lisina C-terminales.

60 La eliminación del residuo de lisina C-terminal puede conseguirse alternativamente mediante la utilización de constructos de vector que no presentan el codón para la lisina C-terminal en los ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada.

Alternativamente, puede eliminarse el residuo de lisina C-terminal mediante procesamiento *in vitro* utilizando enzimas que presentan la actividad de carboxipeptidasa básica deseada.

65 Según la presente invención, puede mejorarse el corte de los residuos de lisina C-terminales optimizando las condiciones para el cultivo de la célula, tejido u organismo con respecto al corte deseado del extremo C-terminal.

La expresión citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) utilizada en la presente memoria se refiere a cualquier actividad para dañar una célula tumoral o similar mediante la activación de una célula efectora mediante la unión de la región Fc de un anticuerpo a un receptor de Fc existentes sobre la superficie de una célula efectora, tal como una célula asesina, una célula asesina natural, un macrófago activado o similar.

5 Un anticuerpo con actividad de ADCC incrementada puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la materia. En los ejemplos se describe un ensayo aceptado.

10 Puede medirse una ADCC incrementada a partir de un potencial lítico incrementado, medido como una reducción de la concentración EC<sub>50</sub> de anticuerpos que indica la concentración de anticuerpos necesaria para lisar específicamente la mitad de la cantidad máxima de células diana.

15 La expresión citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se define como la toxicidad celular directa mediante la unión y activación del complemento. Un anticuerpo se une a su diana sobre la superficie celular de, por ejemplo, la célula tumoral e inicia el sistema del complemento, también conocido como "cascada del complemento", resultando en un complejo de ataque membranal que literalmente realiza un orificio en la membrana celular, causando la lisis y muerte celulares.

20 Un anticuerpo con una actividad de CDC reducida puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la materia. En los ejemplos se describe un ejemplo aceptado.

25 Puede definirse la actividad de CDC reducida como una concentración EC<sub>50</sub> de anticuerpos incrementada que permite la lisis de la mitad de la cantidad máxima de células diana. La actividad de CDC del anticuerpo según la presente invención puede reducirse hasta en 10%, alternativamente hasta 20%, alternativamente hasta 30%. En otras formas de realización la actividad de CDC no resulta modificada.

30 La actividad de unión del anticuerpo de la invención al antígeno diana, por ejemplo al antígeno Lewis-Y, CD20, Ep-CAM o Her-2, es de por lo menos 80% en comparación con el anticuerpo parental, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 100% en comparación con el anticuerpo parental.

35 Un posible objetivo de tratamiento es la unión y reducción efectivas de las células tumorales, es decir, del tejido tumoral o metástasis o, en particular, de células tumorales diseminadas. El número de células tumorales, o micrometástasis, respectivamente, detectable en la sangre, médula ósea u órganos se reduce significativamente. La formación de metástasis se retarda y su crecimiento por lo menos se enlentece. De esta manera, la duración de vida sin recaídas, y de esta manera el tiempo total de supervivencia, de los pacientes puede alargarse mediante la inmunoterapia específicamente dirigida.

40 Comprendida dentro del alcance de uso según la invención, en particular el tratamiento para reducir, o inhibir, respectivamente, el crecimiento de las células tumorales en un paciente de cáncer, también resulta posible una hemodiálisis.

45 Según la invención, está comprendida una preparación farmacéutica que contiene el anticuerpo según la invención en un portador o diluyente farmacéutico. La preparación puede utilizarse para preparar un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico para reducir o inhibir, respectivamente, el crecimiento de las células tumorales en un paciente. La reducción del crecimiento de las células tumorales puede incrementarse por lo menos en 5% en comparación con la utilización del anticuerpo no modificado específico para el mismo antígeno.

50 Una preparación que contenga el anticuerpo según la presente invención también resulta útil para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer sólido, preferentemente de origen epitelial, o de enfermedad residual mínima.

El anticuerpo de la invención puede utilizarse para la inmunoterapia pasiva.

55 También se proporciona la utilización de los anticuerpos de la invención o su preparación para un procedimiento de cribado (preferentemente *in vitro*) que comprende proporcionar una muestra de un sujeto, preferentemente un ser humano, y detectar sucesos de unión de los anticuerpos a un antígeno en la muestra. De manera similar, se proporciona el procedimiento de cribado, que comprende obtener una muestra de un sujeto (por ejemplo un ser humano), poner en contacto la muestra con los anticuerpos y detectar sucesos de unión. Con este procedimiento pueden identificarse sujetos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención. Además, puede identificarse el anticuerpo/preparación óptimo para el tratamiento de una enfermedad o sujeto particular. Se proporciona además el procedimiento de diagnóstico de una enfermedad específica, que comprende obtener una muestra de un sujeto (que puede sufrir la enfermedad), poner en contacto la muestra con anticuerpos de la invención específicos para un antígeno que es característico de la enfermedad, detectar sucesos de unión de los anticuerpos a antígenos en la muestra y diagnosticar la enfermedad en caso de que se detecten sucesos de unión.

65

Para la unión, se administran todos los receptores especificados (antígenos del anticuerpo/preparación modificado) de una célula tumoral, habitualmente dosis de por lo menos 1 mg/dosis, preferentemente de por lo menos 10 mg/dosis, más preferentemente de por lo menos 50 mg/dosis por cada paciente. La dosis máxima dependerá de la tolerabilidad del anticuerpo, siendo mejor tolerados los anticuerpos humanizados y los anticuerpos humanos. Una dosis de hasta 1 g o en algunos casos de hasta 2 g por cada paciente y tratamiento es perfectamente posible que resulte ventajosa.

Inesperadamente, se ha demostrado en la presente invención que debido a la actividad de ADCC incrementada, puede reducirse la cantidad de anticuerpo aplicada con fines terapéuticos y/o profilácticos, conduciendo sin embargo a efectos terapéuticos positivos incluso a dosis reducidas. Debido a la función efectora de ADCC incrementada, puede reducirse la cantidad de anticuerpo utilizada por lo menos en 10%, preferentemente en por lo menos 20%, más preferentemente en por lo menos 30%, todavía más preferentemente en por lo menos 40%, todavía más preferentemente en por lo menos 50% en comparación con el régimen de dosificación para el anticuerpo parental.

El tratamiento preferentemente se repite a determinados intervalos de tiempo, según la vida media del anticuerpo utilizado, que habitualmente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 3 y 30 días. Particularmente mediante la derivación del anticuerpo resulta posible incrementar la vida media hasta a varios meses y de esta manera alargar correspondientemente los intervalos de tratamiento.

El medicamento utilizado según la invención preferentemente se proporciona en una formulación adecuada. Resultan preferentes formulaciones con un portador farmacéuticamente aceptable. Entre estos últimos se incluyen, por ejemplo, agentes auxiliares, tampones, sales y conservantes. Preferentemente se proporciona una solución de infusión lista para utilizar. Debido a que un anticuerpo es relativamente estable, los medicamentos basados en anticuerpos o derivados de los mismos presentan la ventaja sustancial de que pueden comercializarse en forma de solución de almacenamiento estable o de formulación en una forma lista para utilizar. La primera preferentemente es de almacenamiento estable en la formulación a temperaturas de entre las de refrigeración y la temperatura ambiente. Sin embargo, el medicamento utilizado según la invención puede proporcionarse en forma congelada o liofilizada, que puede descongelarse o reconstituirse en el momento que se requiera.

La concentración de la sustancia activa del medicamento dependerá de su tolerabilidad. Una preparación particularmente tolerable basada en un anticuerpo humanizado puede administrarse directamente en el paciente a una concentración elevada sin dilución adicional. Con una concentración preferente de entre 0,1% y 10%, preferentemente de entre 1% y 5%, resulta posible mantener bajos el volumen administrado y el tiempo de infusión correspondiente.

Habitualmente, el medicamento se administra por vía intravenosa. De manera similar, sin embargo, puede seleccionarse también otra vía de administración parenteral o mucosa, que lleve la sustancia activa a una aplicación sistémica o local en el sitio del tumor o de las metástasis.

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes explican la presente invención con mayor detalle aunque, sin embargo, sin limitarla.

### Ejemplo 1: materiales y procedimientos

#### Líneas celulares de mamífero y cepas de producción de musgo

Las líneas celulares tumorales TF-1 (Kitamura T. *et al.*, J. Cell Physiol. 140:323-334, 1989), Ovc3-3 (Hamilton T.C. *et al.*, Cancer Res. 43:5379-5389, 1983), SK-BR-3 (Trempe G.L., Recent Results Cancer Res. 57:33-41, 1976) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, CA). Se midió la densidad de antígeno diana (Lewis-Y) mediante análisis FACS utilizando el anticuerpo IGN311 humanizado específico de Lewis-Y en una serie de dilución de 1 ng/ml a 100 µg/ml. Se informó de valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) a 10 µg/ml para el análisis posterior.

Se utilizó *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Axyl-t/Δfuc-t línea de doble inactivación génica, según Koprivova A. *et al.* (Plant Biotechnol. J. 2:517-523, 2004). Para la generación de protoplastos de musgo se cultivó una línea seleccionada doblemente inactivada Δxyl-t/Δfuc-t en fotobiorreactores tal como se ha descrito previamente (Hohe A. y Reski R., Plant Sci. 163:69-74, 2002).

Producción de anticuerpos recombinantes

Se expresó anticuerpo de control IGN311 de grado clínico en células SP 2.0 utilizando un procedimiento de producción de fibra hueca que contenía FCS y un procedimiento posterior clásico que incluía una etapa de captura con proteína A.

La variante de IGN311 glicomanipulada  $\Delta xyl-t/\Delta fuc-t$  de doble inactivación génica expresada en musgo se denominó IGN314. Las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de IGN311 (excluyendo sus péptidos de señal respectivos) se amplificaron por PCR (polimerasa pfu) y se clonaron con los extremos romos en el vector de expresión de musgo p127, diseñado para secretar los correspondientes productos génicos mediante la utilización de un péptido de señal vegetal (Gorr G. y Jost W., *Bioprocessing J.* 4:26-30, 2005; Weise *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:337-345). Los constructos resultantes (p127-IGN-HC y p127-IGN-LC, respectivamente) se verificaron mediante digestión de restricción y secuenciación. La transformación de los protoplastos de musgo se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente, en Jost *et al.*, *Curr. Genet.* 47:111-120, 2005, mediante la utilización simultánea de 45  $\mu\text{g}$  de cada uno de los dos constructos y con las modificaciones siguientes: se utilizó tres veces el número de protoplastos y seis veces la cantidad de solución PEG (añadidos a la mezcla de protoplastos/ADN, seguido de una incubación de 12 minutos) conjuntamente con el medio estándar (3 M; 480mOsm; Jost W. *et al.*, *Curr. Genet.* 47:111-120, 2005). Debido a que los títulos de IgG en el medio estándar resultaron ser relativamente bajos, para la producción en masa se llevaron a cabo en total 167 transformaciones en ocho días diferentes bajo condiciones de medio optimizado (mezcla 1:1 de medio estándar con medio W5; Baur A. *et al.*, *J. Biotechnol.* 119:332-342, 2005). Todos los medios se suplementaron con BSA al 0,01% (p/v). Tras el procedimiento de transformación, las células se reservaron en 400  $\mu\text{l}$  de medio y posteriormente 300  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cultivo fueron sustituidos por medio idéntico fresco. Las transformaciones simuladas sirvieron de controles negativos (no purificado y copurificado). Cada semana se agruparon los sobrenadantes de todas las transformaciones realizadas en un mismo día y se purificaron mediante carga directa en columnas HiTrap-proteína A equilibrada de 1 ml (Amersham). Se analizaron los sobrenadantes de cultivo en bruto, así como los anticuerpos purificados, mediante un ELISA de tipo sándwich anti-idiotípico y SDS-PAGE con tinción de plata.

Para la generación de plantas transformadas establemente, se llevó a cabo la transferencia directa de ADN mediada por PEG tal como se ha descrito previamente (Jost *et al.*, *Curr. Genet.* 47:111-120, 2005). Se preparó el ADN mediante digestión de p127-IGN-HC y p127-IGN-LC con los enzimas de restricción XhoI, HindIII y Scal. Las bandas de ADN relacionadas con la digestión con XhoI/HindIII, que comprendían las secuencias promotoras de la expresión, las secuencias codificantes de la cadena ligera o pesada fusionada con el péptido de señal vegetal y la señal de terminación, se separaron mediante electroforesis en gel, se extrajeron y se eluyeron de la matriz de gel. Los protoplastos se aislaron de las líneas doblemente inactivadas  $\Delta xyl-t/\Delta fuc-t$  y se cotransformaron con 5  $\mu\text{g}$  de cada uno de los constructos de ADN linearizados y eluidos. Tras el procedimiento de transformación y posteriores etapas de dilución y lavado, los protoplastos se incubaron en medio de regeneración (medio Knop que contenía 6% de glicosa y 3,6% de mannit, pH 5,6, ~580 mOsm) durante la noche a razón de 5  $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , seguido de la incubación con 40 a 50  $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de luz durante 7 a 10 días.

Las líneas transgénicas que contenían ambos constructos y que produjeron IGN314 ensamblado se aislaron mediante cribado para la producción de anticuerpos con un ELISA de tipo sándwich anti-idiotípico. Las líneas transgénicas identificadas se cultivaron adicionalmente en medio Knop.

Determinación de los perfiles de oligosacáridos N-ligados

Se aislaron cadenas pesadas de IGN311 e IGN314 de las muestras mediante SDS-PAGE reductora, tal como se describe en Kolarich D. y Altmann, *Anal. Biochem.* 285:64-75, 2000. Se extrajeron las bandas teñidas con Coomassie, se destiñeron, se carbamidometilaron, se digirieron con tripsina y se extrajeron a partir de trozos del gel tal como se describe en Kolarich D., *supra*. Los extractos se llevaron a sequedad en un concentrador Speed-Vac y se reconstituyeron con agua que contenía ácido fórmico al 0,1%. El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo en un Q-TOF Ultima Global (Waters Micromass) dotado de una unidad de electropulverización estándar, un sistema Cap-LC (Waters Micromass) y un módulo de distribución de solventes de 10 puertos (Rheodyne). En primer lugar las muestras se capturaron en una precolumna C18 Aquasil (30x0,32 mm, Thermo Electron) utilizando agua como el solvente. La columna analítica se mantuvo en 5% de acetonitrilo antes de cambiar el solvente y después se aplicó un gradiente lineal de 5% a 50% de acetonitrilo a un caudal de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Todos los eluyentes contenían ácido fórmico al 0,1%. El ajuste de masas del analizador TOF se llevó a cabo en el modo de EM en tándem utilizando nuevamente [Glu1]-fibrinopéptido B. Las muestras se analizaron en el modo de EM. Debido a que no se llevó a cabo ningún cambio entre los modos de EM y EM en tándem, no se produjeron pérdidas de señal, especialmente para el análisis de los glucopéptidos. El análisis de los datos se llevó a cabo con el software MassLynx 4.0 SP4 (Waters Micromass).

Procedimientos analíticos

La integridad, el peso molecular y los potenciales productos de degradación del producto de expresión purificado se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando un sistema de electroforesis Novex (Invitrogen) en geles NuPAGE 4-Bis-

Tris al 12% siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles se tiñeron con plata (SilverQuest, Invitrogen). Se llevó a cabo HPLC de exclusión por tamaño para analizar los anticuerpos en términos de pureza, integridad y degradación potencial. Las muestras se analizaron utilizando una columna ZORBAX G-250 (Agilent Technologies) en un sistema de HPLC Dionex. Con el fin de desintegrar los potenciales agregados e inhibir la potencial precipitación, se utilizó  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  220 mM (pH=7,0) con acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) al 10% como tampón de migración (caudal: 1 ml/min). Se realizó un seguimiento en línea del efluente en 214 y 280 nm. Se calculó la concentración de producto mediante estandarización respecto a una IgG humana policlonal (Pentaglobin<sup>®</sup>, Biotest) mediante integración de los picos.

Se determinó la concentración de endotoxina utilizando un kit de detección LAL disponible comercialmente (Charles River Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recogieron los datos de citometría de flujo en un instrumento FACS-CALIBUR (Becton Dickinson). La expresión de antígenos en las líneas celulares investigadas se cuantificó utilizando el anticuerpo IGN311 específico de Lewis-Y en un intervalo de concentraciones de entre 100  $\mu\text{g/ml}$  y 1,6 ng/ml. La evaluación se llevó a cabo a 10 mg/ml.

#### Determinación de la especificidad de unión

La actividad de unión de los productos de expresión se analizó en un ELISA de tipo sándwich específico mediante la incubación de muestras de anticuerpos en series de dilución (de 100 pg a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) en pocillos de microtitulación recubiertos con el anticuerpo monoclonal anti-idiotípico MMA383 (Perkins M. *et al.*, Pharm. Res. 17:1110-1117, 2000). Tras el bloqueo con FCS al 5% y el lavado, se determinó el producto de expresión unido mediante reacción con un conjugado de inmunoglobulina de cabra-peroxidasa específico para IgG, IgM e IgA humanas (Zymed, CA) y se tiñeron con o-fenilendiamina/peróxido de hidrógeno. Las densidades ópticas (492 nm) se proporcionaron en un gráfico versus el logaritmo de la concentración de anticuerpo (ng/ml) y se ajustaron utilizando una curva sigmoideal de cuatro parámetros utilizando el software GraphPad Prism 4. Se calcularon los valores de EC50 y se utilizaron para la cuantificación.

#### Determinación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Se sometió a ensayo por triplicado la actividad de lisis celular mediada por el complemento en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  utilizando como diana la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 positiva para Lewis-Y. Las células diana se incubaron durante una hora con 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$ , se lavaron dos veces con medio y se sembraron en una placa a una densidad de  $20 \times 10^3$  células en cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos conjuntamente con una serie de dilución de la muestra que debía analizarse (72 ng a 75  $\mu\text{g/ml}$ ) y suero de complemento activo procedente de un donante voluntario. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C en un incubador de  $\text{CO}_2$ . Se recogieron los sobrenadantes y se realizó un recuento del  $^{51}\text{Cr}$  liberado ("Cs"). Los valores de liberación espontánea ("Sr") y de máxima liberación ("Mr") se midieron tras la incubación de muestras representativas con medio solo y con detergente (SDS), respectivamente. Se calculó la citotoxicidad mediada por el complemento como el porcentaje de lisis celular siguiendo la fórmula  $100 \times (\text{Cs}-\text{Sr}) / (\text{Mr}-\text{Sr})$  y se proporcionó en un gráfico frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo (ng/ml) y se ajustó utilizando una curva sigmoideal de cuatro parámetros utilizando el software GraphPad Prism 4. Se calcularon los valores de EC<sub>50</sub> y se utilizaron para la cuantificación. Las muestras con datos de lisis negativos se fijaron en 0%.

#### Determinación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se sometió a ensayo la ADCC por triplicado en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  utilizando diversas líneas celulares de cáncer positivas para Lewis-Y como células diana (SK-BR-3, TF-1, Kato-III y Ovc4r-3). Las células diana se incubaron durante una hora con 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$ , se lavaron y se sembraron en una placa a una densidad de  $25 \times 10^3$  células en cada pocillo en microplacas de 96 pocillos. Se prepararon frescas las células efectoras (PBMC procedentes de un donante voluntario sano) y se añadieron a las células diana hasta alcanzar proporciones E:T de 40:1 conjuntamente con series de dilución (100 pg a 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de la muestra de anticuerpos que debía analizarse. Tras la incubación a 37°C durante 16 horas en un incubador de  $\text{CO}_2$ , se recogieron los sobrenadantes celulares y se realizó un recuento para el  $^{51}\text{Cr}$  liberado ("Cs"). Se midieron los valores de liberación espontánea ("Sr") y de liberación máxima ("Cs") tras la incubación de muestras representativas con medio solo y con detergente (SDS), respectivamente. Se calculó la citotoxicidad como el porcentaje de lisis celular mediante la fórmula  $100 \times (\text{Cs}-\text{Sr}) / (\text{Mr}-\text{Sr})$ . El porcentaje de citotoxicidad se proporciona en un gráfico frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo (ng/ml) y se ajustó utilizando una curva sigmoideal de cuatro parámetros utilizando el software GraphPad Prism 4. Se calcularon los valores de EC50 y se utilizaron para la cuantificación.

#### Genotipado de CD16 de los donantes de PBMC

Se analizó el polimorfismo de CD16 (Fc  $\gamma$ RIIIa)-158V/F mediante un ensayo de análisis de restricción específico de alelo basado en PCR ligeramente modificado respecto a un procedimiento descrito por Koene H.R. *et al.*, Blood 90:1109-1114, 1997.

Resultados: expresión y caracterización de IGN314

Se transformaron transitoriamente protoplastos de musgo  $\Delta xyl-t/\Delta fuc-t$  con constructos de expresión de cadena pesada y ligera (p127-IGN-HC, p127-IGN-LC) y se estimaron semanalmente los títulos de IgG1 en agrupados de sobrenadantes de cultivo mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) de tipo sándwich anti-idiotípico. Bajo condiciones de cultivo estándares se encontró que los títulos de IgG1 eran relativamente bajos (0,1 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Sin embargo, la secreción de IGN314 se incrementó significativamente durante un periodo de más de tres meses bajo condiciones de medio optimizadas. En total, lo anterior resultó en 3,8 mg de IGN314 en 14 semanas para la totalidad de las 167 transformaciones realizadas (media global: 6,1  $\mu\text{g/ml}$ ), obteniendo ya 2,0 mg tras 5 semanas de recolección de muestras. Los sobrenadantes de cultivo en bruto teñidos con plata en geles de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida, aparte de un fondo generalmente bajo de proteínas contaminantes en el cultivo del musgo, no revelaron bandas suplementarias correspondientes a cadenas pesadas o ligeras proteolíticamente procesadas o alteradas o fragmentos de anticuerpos más pequeños y demostraron una tasa elevada de ensamblaje completo de IgG1. Se agruparon los sobrenadantes de cultivo, se sometieron a purificación con proteína A y el IGN314 purificado se analizó en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de exclusión por tamaño, así como en un ELISA de tipo sándwich anti-idiotípico, con el fin de someter a ensayo su especificidad de unión a antígeno. Los resultados se proporcionan en la figura 3 y demuestran la integridad de IGN314 con respecto al ensamblaje, pureza y afinidad para el antígeno diana de IgG1. Además, se llevó a cabo un mapeado peptídico de las cadenas pesadas y ligeras y en ambos casos se verificó un corte exacto del péptido de señal vegetal, así como de secuencias de aminoácidos primarias idénticas en IGN311 e IGN314, incluyendo la eliminación del a lisina C-terminal en ambas cadenas pesadas.

El análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masa (CL-EM) reveló diferentes patrones de N-glicosilación para las cadenas pesadas de IGN311 y de IGN314, respectivamente (fig. 4). En particular, las muestras diferían respecto a la cantidad de fucosilación nuclear, galactosilación terminal y el grado de glicosilación global. IGN311 se encontraba fucosilada prácticamente por completo y contenía un grado sustancial de galactosilación terminal, tal como se esperaría de las moléculas de IgG expresadas en las células huésped de mamífero. En el caso de IGN314 producido por la cepa de musco glicomanipulada utilizada en el presente estudio, no pudieron detectarse estructuras de glicano que contuviesen galactosa o fucosa y se detectaron cantidades menores de N-glicanos de IGN314 terminados en manosa. En contraste con IGN311, IGN314 también contenía una cantidad considerable de cadenas pesadas no glicosiladas, mientras que IGN311 se encontraba completamente glicosilada. Ninguna de las dos muestras contenía residuos de xilosa.

## Funciones efectoras

Se comparó el potencial lítico de IGN314 glicomanipulado con el de IGN311 y se intentaron cubrir los aspectos de diversidad biológica que pueden surgir en la inmunoterapia del cáncer. Esta diversidad se refiere tanto a las células diana como a las células efectoras, ya que las densidades del antígeno diana expresadas sobre las células diana de tumores individuales son diferentes y diferentes pacientes muestran variaciones de la afinidad para IgG relacionadas con diferentes alelos del receptor CD16 expresado sobre las células efectoras asesinas naturales (NK) debido a un polimorfismo genético que afecta al aminoácido en la posición 158 (CD16<sub>158V/F</sub>). Por lo tanto, se analizaron por una parte tres líneas celulares tumorales diferentes que expresan el antígeno Lewis-Y membranar a diferentes densidades (Ovcar-3- SK-BR-3 y TF-1). Estas líneas celulares diana se analizaron antes de los experimentos de ADCC para sus densidades de Lewis-Y mediante separación celular asistida por fluorescencia (FACS). Ovcar-3 mostró la densidad de antígeno más elevada, seguido de SK-BR-3 y TF-1 (ver en la Tabla 1 los valores de intensidad media de fluorescencia). Por otra parte, el polimorfismo de CD16<sub>158</sub> de los donantes de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se analizó para utilizar preparaciones de células efectoras definidas y se encontró que aproximadamente 50% (5 de 10) expresaba el fenotipo de alta afinidad CD16<sub>158V/V</sub> (no mostrado). Las preparaciones de PBMC de donantes de ambos fenotipos, es decir 158<sub>V/V</sub> y 158<sub>F/F</sub>, se prepararon para todos los ensayos de ADCC. La ausencia de endotoxinas en todas las muestras se confirmó previamente a las mediciones. También se investigaron sobrenadantes de cultivo simultáneamente purificados de falsas transformaciones y no mostraron ninguna actividad lítica diferente del nivel de fondo. Los resultados de los experimentos de ADCC (los valores calculados de concentración efectiva al 50% (EC<sub>50</sub>)) se resumen en la Tabla 1. Los valores de EC<sub>50</sub> medidos para IGN314 eran significativamente más bajos que los de IGN311, lo que significa que IGN314 presenta un potencial lítico mediado por la citotoxicidad celular 7 a 40 veces mayor que el anticuerpo parental IGN311. Además, se observó una correlación inversa para ambos anticuerpos entre la densidad de Lewis-Y sobre las células diana y las concentraciones de EC<sub>50</sub>. En comparación con las líneas celulares con una densidad baja de antígeno diana Lewis-Y (TF-1), las líneas celulares con densidad elevada del antígeno diana (Ovcar-3) requirieron concentraciones de anticuerpos mucho más bajas para inducir la misma lisis. Los valores de EC<sub>50</sub> medidos en líneas celulares con densidad moderada de antígeno (SK-BR-3), tal como se esperaba se encontraban comprendidos entre los calculados para las líneas celulares de densidades elevadas y bajas de antígeno.

Respecto al fenotipo de CD16, las células efectoras preparadas a partir de donantes de receptores de alta afinidad (158<sub>V/V</sub>) mostraron una actividad lítica más elevada que las células obtenidas de los donantes 158<sub>F/F</sub>, cuya afinidad para IgG se ha informado de que es inferior (Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Niwa R. *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:6248-6255, 2004). Sobre las células diana Ovcar-3, los valores de EC<sub>50</sub> calculados para

ambos anticuerpos en un experimento de lisis con PBMC derivadas de un donante CD16 158V/V eran tres veces más bajos que los valores obtenidos en un diseño idéntico con PBMS procedentes de un donante CD16 158F/F. En resumen, una reducción de como máximo 40 veces de la concentración de IGN314 conduce al mismo efecto de lisis de ADCC (EC50) en comparación con IGN311 (Ovcar-3, comparar en la Tabla 1) y esta reducción es independiente del fenotipo de CD16 de las células efectoras (158<sub>V/V</sub> ó 158<sub>F/F</sub>).

Tabla 1: comparación entre los potenciales líticos de IGN311 e IGN314 sobre líneas celulares con diferente densidad de diana Lewis-Y utilizando células efectoras (NK) de ambos fenotipos de CD16<sub>158</sub> (IMF: intensidad media de fluorescencia; EC<sub>50</sub>: concentración efectiva al 50%).

Línea celular diana	Densidades de Lewis-Y (IMF)	Fenotipo de CD16 158 de células efectoras	IGN311 (µg/ml)	IGN314 (µg/ml)	Factor de mejora
OVCAR-3	435	V/V	0,315 ± 0,2	0,008 ± 0,005	39
OVCAR-3	435	F/F	0,993 ± 0,3	0,025 ± 0,01	40
SK-BR-3	213	V/V	1,040 ± 0,1	0,144 ± 0,02	7
TF-1	109	V/V	5,318 ± 3,2	0,366 ± 0,06	15

En un segundo conjunto de experimentos de lisis utilizando células diana SK-BR-3, se comparó el potencial lítico de IGN314 para la activación del complemento (CDC) con el de IGN311 y con el de IGN311 desglucosilado. IGN311 mostró la curva de lisis esperada (valor de EC50 de 19,6 ± 1,5 µg/ml), mientras que la actividad lítica mediada por el complemento de IGN314 se encontraba drásticamente reducida en los valores máximos así como en las concentraciones EC<sub>50</sub>. IGN311 desglucosilado no mostró ninguna actividad lítica en absoluto.

#### Efectos séricos

En el suero natural se requieren concentraciones elevadas de anticuerpos IgG1 terapéuticos para compensar la inhibición de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por parte de la inmunoglobulina G endógena en exceso. Los niveles séricos normales de IgG bloquean la unión de un anticuerpo IgG1 terapéutico al receptor de IgG de baja afinidad (CD16), el cual se encuentra presente sobre las células NK. Conjuntamente con CD64, dichos receptores de Fcγ son los receptores celulares principales que median en la ADCC.

Una posibilidad para superar el efecto inhibitorio de la IgG sérica es la utilización de cantidades elevadas del anticuerpo terapéutico. Sin embargo, este enfoque resulta costoso y podría asociarse a efectos secundarios relacionados con la dosis causados por una mayor reactividad cruzada con el tejido normal, una actividad del complemento incrementada, efectos secundarios severos de la primera dosis, la inducción de una respuesta de anticuerpo humano anti-humano (HABA) o la generación de complejos inmunológicos. Otro enfoque es la utilización de anticuerpos terapéuticos que han sido manipulados para presentar una afinidad mejorada para los receptores de Fcγ. Para la unión de los anticuerpos a FcγR, resulta esencial la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al residuo Asn297 conservado en la región CH2 de la cadena pesada de anticuerpo (figura 5, panel A) y se ha sugerido que las estructuras de carbohidrato estabilizan una conformación que facilita la unión. Tal como se ilustra en la figura 5, panel B, Asn297 se encuentra situado contiguamente al sitio de unión de receptor; sin embargo, se ha demostrado que los dominios carbohidrato se encuentran orientados alejándose de la interfaz sin realizar contactos específicos con el receptor.

Con respecto al enfoque de glicosilación, puede incrementarse la actividad de ADCC de los anticuerpos mediante la modificación de su glicosilación, de un núcleo fucosilado de tipo complejo típico a una estructura sin esta fucosilación nuclear. Este tipo de anticuerpos defucosilados pueden generarse mediante cotransfección de genes que afectan al aparato de glicosilación, mediante la expresión en huéspedes de producción que no presentan enzimas específicos de glicosilación o mediante la alteración de la expresión de los enzimas respectivos.

Anteriormente se ha demostrado que una variante glicomanipulada del anticuerpo humanizado IGN311 específico de Lewis-Y, sin los residuos de fucosa nucleares, muestra una actividad de ADCC incrementada en 29 veces sobre las células tumorales SK-BR-5 positivas para Lewis-Y en comparación con el anticuerpo de tipo salvaje portador del patrón característico de oligosacáridos nucleares fucosilados N-ligados (documento WO nº 2004/062556). Se generó IGN311 defucosilado, denominado IGN312, mediante ingeniería genética de la maquinaria de glicosilación del huésped productor de anticuerpos mediante la cotransfección transitoria de genes de acetil-glicosaminiltransferasa III y cadenas pesada y ligera de IGN311 en células renales embrionarias humanas-antígeno nuclear del VEB. Con la presente invención se demostró un incremento de hasta 40 veces en la actividad de ADCC mediante la expresión de los genes de IGN311 para cadenas pesada ya ligera en un sistema de expresión vegetal glico-optimizado alternativo, es decir, el musgo *Physcomitrella patens* con inactivación de los genes de β1,2-xilosiltransferasa y de α1,3-fucosiltransferasa. En resumen, mediante la utilización de ambos enfoques (sistemas de expresión deficientes en fucosilo de mamífero y vegetal), se ha demostrado un incremento significativo de la potencia de ADCC del anticuerpo monoclonal humanizado terapéutico IGN314 que permite minimizar la dosis terapéutica necesaria. La actividad de ADCC mejorada del anticuerpo glicomanipulado se debe por lo menos en parte a una unión

incrementada de la parte Fc a receptores de FcγRIII sobre las células efectoras, es decir, las células NK que son los agentes principales de la actividad de ADCC encontrada con los anticuerpos terapéuticos.

5 La afinidad incrementada mediada por IGN314 defucosilado puede explicarse por un comportamiento termodinámico favorable para la unión a los receptores de FcγRIII sobre las células efectoras en comparación con el IgG endógena. Se investigó si el suero normal humano (NHS) afecta a la capacidad de IGN311 y de IGN314 defucosilado, respectivamente, para llevar a cabo la ADCC. En primer lugar, se demuestra que IGN311 diluido en suero humano normal (NHS) al 10% o 40% mostraba una actividad de ADCC significativamente menor que en suero de feto bovino (FCS) al 10%, indicando que el NHS reduce significativamente la función efectora de IGN311 (fig. 6, líneas grises). En contraste, la variante defucosilada no resultó afectada por el NHS (fig. 6, líneas negras) y además presentaba un valor de EC<sub>50</sub> favorable en comparación con IGN311 de tipo salvaje tanto en FCS como en NHS. Además, los datos indican que la glicomanipulación de los anticuerpos terapéuticos puede compensar la inhibición mediada por la IgG endógena de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos *in vivo*.

15 Se evaluó el potencial de lisis a la EC<sub>50</sub>: 0,301 µg/ml (IC al 95%: 0,169-0,537) y 0,052 µg/ml (IC al 95%: 0,028-0,094) para IGN311 parental de tipo salvaje e IGN314 glicomodificada, respectivamente, en FCS al 10% y 1,558 µg/ml (IC al 95%: 0,989-2,457) y 0,126 µg/ml (IC al 95%: 0,065-0,244) para IGN311 parental e IGN314 glicomodificada, respectivamente en NHS al 40%. Se calcularon los valores de EC<sub>50</sub> utilizando el software GraphPad Prism.

20 Además, una limitación de las terapias basadas en anticuerpos clásicas es el polimorfismo funcional de los receptores de FcγRIII sobre las células efectoras. La isoforma FcγRIII-158<sub>V</sub>, que se encuentra presente a menor frecuencia en la población humana, muestra una elevada afinidad para los anticuerpos tanto natural como glicomanipulado, mientras que la isoforma predominante FcγRIII-158<sub>F</sub>, presenta afinidad elevada sólo para los anticuerpos glicomanipulados. Por lo tanto, la glicomanipulación incrementa drásticamente el número de respondedores clínicos a terapias pasivas de anticuerpos basadas en el incremento de las funciones efectoras líticas en el suero. Estos datos en conjunto sugieren fuertemente que la glicomodificación de anticuerpos terapéuticos se espera que se traduzca en una actividad de ADCC superior en el ser humano.

#### Lisina C-terminal

30 Las moléculas de IgG1 derivadas de suero, así como producidas recombinantemente, muestran microheterogeneidad respecto a la presencia de sus residuos Lys C-terminales. El corte (parcial) del residuo Lys C-terminal conservado es un suceso postraducciona, catalizado por la acción de carboxipeptidasas básicas dentro de la célula (Lazar *et al.*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 18(3):239-244, 2004).

35 El análisis de la IgG policlonal humana con respecto a sus dos variantes trípticas de péptido C-terminal ("SLSLSPGK" y "SLSLSPG-") demuestra que sólo la variante procesada ("SLSLSPG-") se encuentra presente en la muestra. De manera similar, se encontró que se encontraba presente exclusivamente la variante que no presenta Lys en la muestra de rAb IGN314 (expresado en células de musgo). En contraste con estos resultados, ambas variantes peptídicas fueron detectadas en la IGN311 de la muestra (fig. 7).

#### **Listado de secuencias**

45 <110> Greenovation Biotech GmbH  
 <120> Anticuerpos glicomanipulados  
 <130> R 59064  
 50 <150> EP06450095.2  
 <151> 2006-07-11  
 <160> 7  
 55 <170> Patente en versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 60 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región variable de anticuerpo recombinante  
 65 <400> 1



ES 2 529 769 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Ser Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

---

5 <210> 2  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> región variable de anticuerpo recombinante  
 <400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Ser His Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Met Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

---

20 <210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> región variable de anticuerpo recombinante

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Ser His Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Met Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

---

5

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> glucopéptido

15

<400> 4

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 1 5 10

---

20

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> glucopéptido  
 <400> 5

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 1 5

---

30

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35

<220>  
 <223> extremo C-terminal de anticuerpo recombinante

<400> 6

40

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5

---

ES 2 529 769 T3

<210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> extremo C-terminal de anticuerpo recombinante

10

<400> 7

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Preparación de anticuerpos que comprende unos anticuerpos modificados de un animal o derivados o fragmentos de los mismos, que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina y una región Fc, específica para un antígeno, caracterizada por que
- los anticuerpos o derivados o fragmentos de los mismos comprenden una estructura de N-glicano sin fucosa ni xilosa seleccionada de entre  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$  o  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , y
- 10 • por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, más preferentemente por lo menos 99%, todavía más preferentemente por lo menos 100% de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos no presenta un residuo lisina C-terminal.
- 15 2. Preparación de anticuerpos según la reivindicación 1, caracterizada por que las estructuras de N-glicano de los anticuerpos o derivados o fragmentos de los mismos están asimismo exentas de galactosa.
- 20 3. Preparación de anticuerpos según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la preparación de anticuerpos no modificados presenta la misma afinidad para el antígeno que la preparación de los anticuerpos modificados o derivados o fragmentos de los mismos.
- 25 4. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la actividad de ADCC de la preparación resulta por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 15%, más preferentemente por lo menos 20%, menos inhibida en solución de suero al por lo menos 10%, preferentemente al por lo menos 40%, que comprende anticuerpos no específicos del animal, preferentemente un mamífero, que una preparación de anticuerpos no modificados del animal específica para el mismo antígeno.
- 30 5. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la función efectora de ADCC se incrementa por lo menos 5 veces, preferentemente por lo menos 10 veces, especialmente preferentemente por lo menos 20 veces, más preferentemente por lo menos 30 veces, todavía más preferentemente por lo menos 40 veces, todavía más preferentemente aún por lo menos 50 veces, en comparación con la preparación de anticuerpos no modificados del animal, preferentemente una específica para el mismo antígeno.
- 35 6. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que menos de 50%, preferentemente menos de 30%, más preferentemente menos de 10% de los anticuerpos, derivados o fragmentos de los mismos carece de una estructura de N-glicano.
- 40 7. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que el animal es un mamífero, preferentemente un ser humano, o un camello o un ratón, o un reptil, preferentemente un cocodrilo y/o los anticuerpos modificados del animal o derivados o fragmentos de los mismos son quiméricos, humanizados o humanos y/o monoclonales.
- 45 8. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que la actividad de ADCC de la preparación resulta por lo menos 20%, preferentemente por lo menos 30%, menos inhibida en la solución de anticuerpos no específicos.
- 50 9. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que la actividad CDC está disminuida por lo menos 10% en comparación con una preparación de anticuerpos no modificados específica para el mismo antígeno.
- 55 10. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que la unión de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos a  $\text{CD16}_{158\text{F/F}}$  resulta por lo menos 10% menos inhibida en una solución de suero al por lo menos 10%, preferentemente al por lo menos 40%, que comprende anticuerpos no específicos del animal, que una preparación de anticuerpos no modificados del animal específica para el mismo antígeno y/o por que la lisis celular de las dianas de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos, mediada por las células efectoras de cualquier genotipo  $\text{CD16}_{158}$  resulta por lo menos 10% menos inhibida en una solución de suero al por lo menos 10%, preferentemente al por lo menos 40%, que comprende anticuerpos no específicos del animal, que una preparación de anticuerpos no modificados del animal específica para el mismo antígeno.
- 60 11. Preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que los anticuerpos modificados son anticuerpos IgG.
- 65 12. Preparación a base de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su utilización como un medicamento.

- 5 13. Utilización de una preparación a base de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico para la reducción o la inhibición, respectivamente, del crecimiento de células tumorales en un paciente, preferentemente un humano o un mamífero, o para el tratamiento de un cáncer sólido, preferentemente de origen epitelial, preferida en particular para la inmunoterapia pasiva, especialmente preferida en la que el anticuerpo o mezcla de anticuerpos es utilizado/a en una dosificación de por lo menos 1 mg/dosis, preferentemente en una dosificación de por lo menos 10 mg/dosis, más preferentemente en una dosificación de por lo menos 50 mg/dosis.
- 10 14. Procedimiento para la fabricación de una preparación de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que los anticuerpos, fragmentos o derivados, que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina y una región Fc, están expresados en células vegetales, que son deficientes en actividad de  $\beta$ 1,2-xilosiltransferasa y actividad de  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa, siendo preferentemente además deficientes en actividad de 1,4-galactosiltransferasa, preferida en particular con un ADN que codifica los anticuerpos, fragmentos o derivados utilizado para expresar los anticuerpos, fragmentos o derivados carece del codón para la lisina C-terminal, o en el
- 15 que se elimina la lisina C-terminal de los anticuerpos, fragmentos o derivados, preferentemente mediante una carboxipeptidasa.

Fig. 1:

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW  
YLQKPGQSPQ LLISKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI  
SRVEAEDVGV YYCFQGSHVP FTFGQGTKLEIK

Fig. 2:

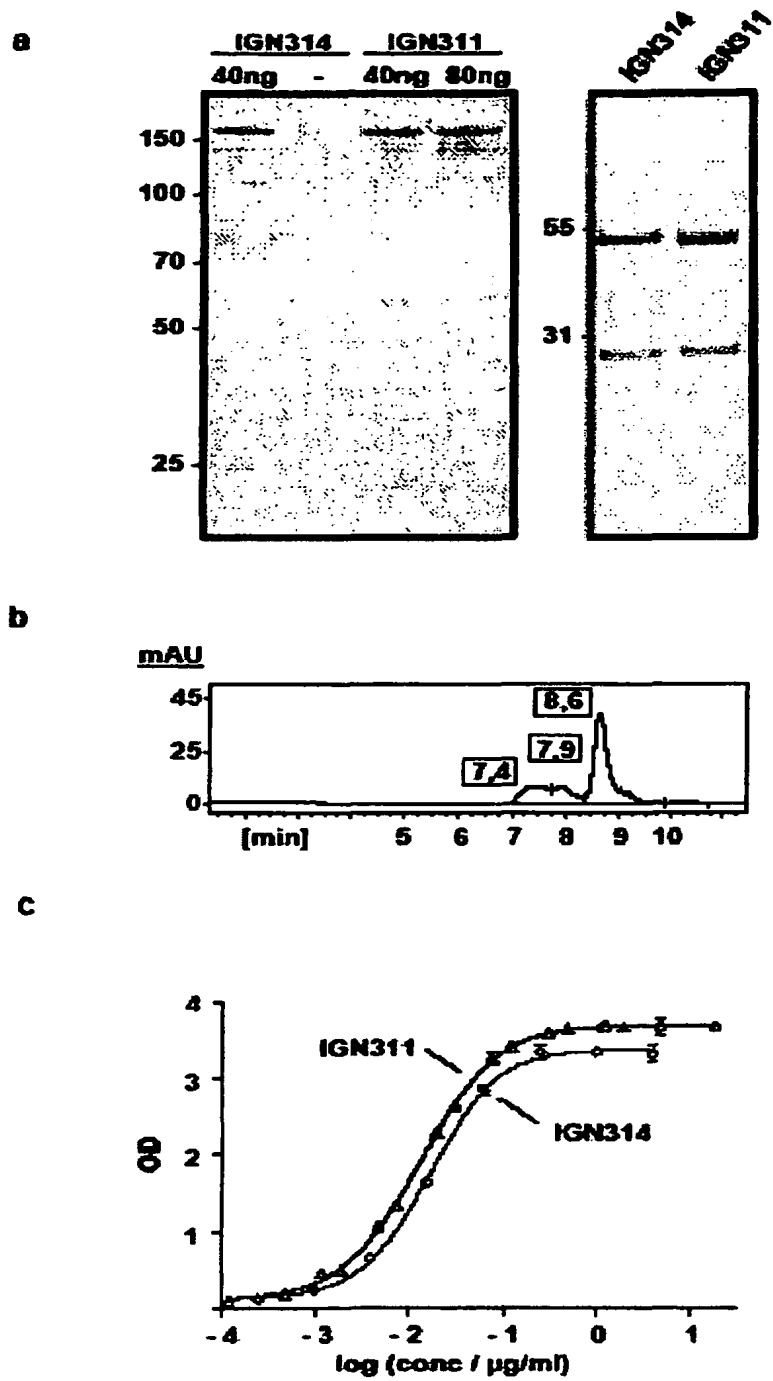
Sec. 1

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMYWWRQA  
PEKRLEWAY ISNGGGSSHY VDSVKGRFTI SRDNSKNTLY  
LQMNSLRAED TALYHCARGM DYGAWFAYWG QGTLVTVSS

Sec. 2

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMYWWRQA  
PEKRLEWAY ISNGGGSSHY VDSVKGRFTI SRDNAKNTLY  
LQMNSLRAED TALYHCARGM DYGAWFAYWG QGTLVTVSS

Fig. 3



**Fig. 4**

IGN311	IGN314
GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Fuc	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>
GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAcFuc	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc
GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> FucGal	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> FucGal <sub>2</sub>	

**Fig. 5**

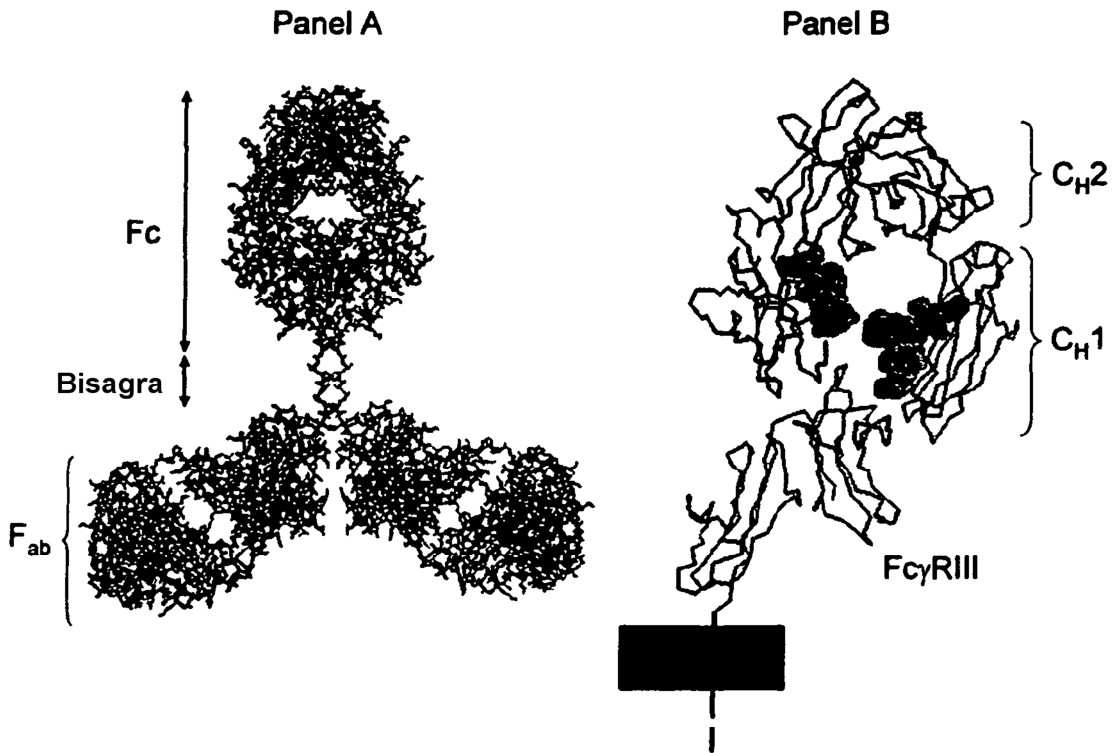




Fig. 6

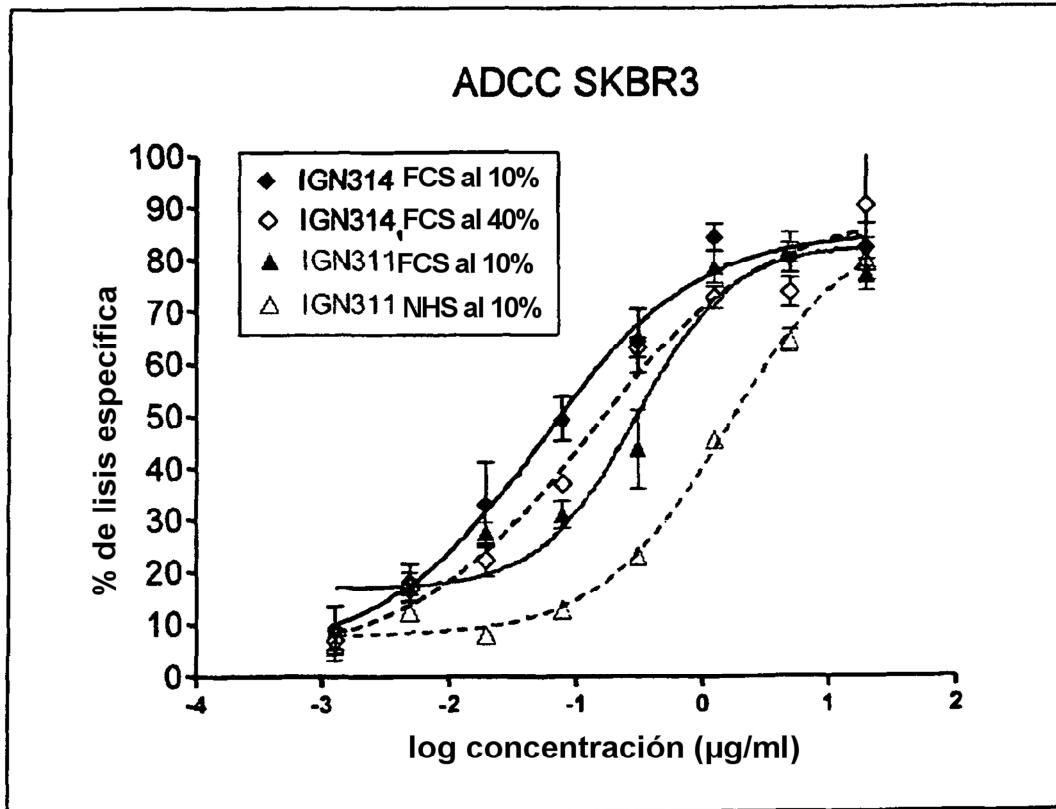


Fig. 7A

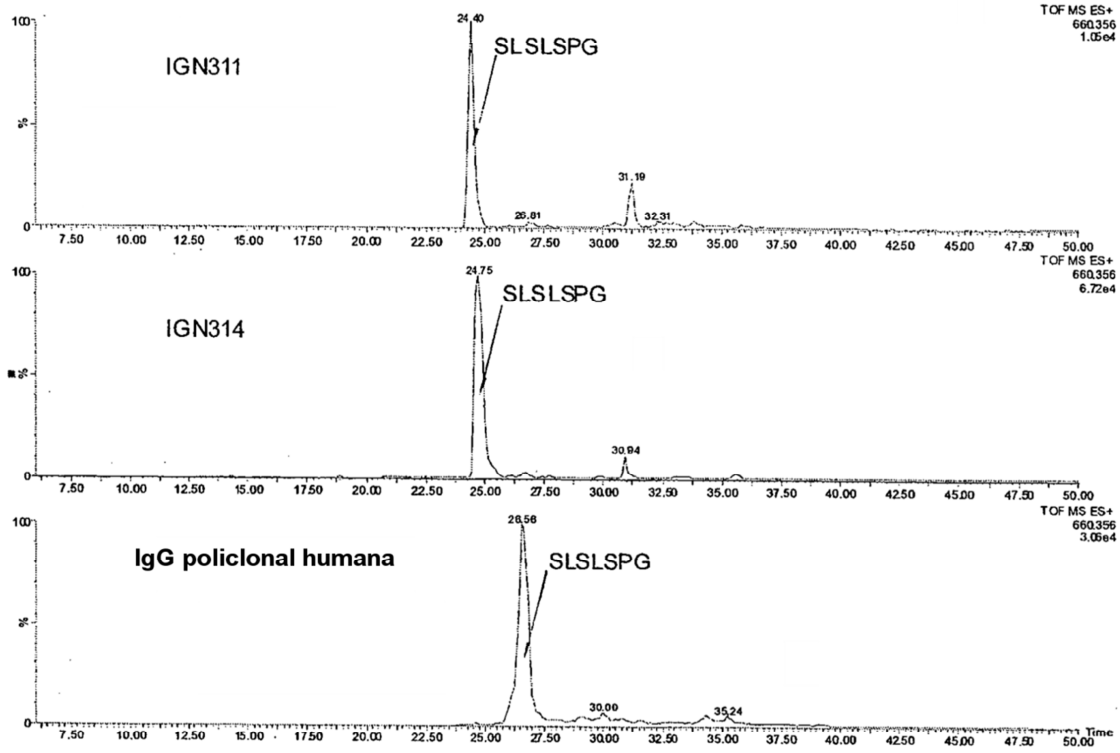


Fig. 7B

