

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 685**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 06774442 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 1896071**

54 Título: **Métodos y composiciones con actividad terapéutica mejorada**

30 Prioridad:

30.06.2005 US 695769 P
26.05.2006 US 809106 P

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

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

CAI, ANN;
NGO, CAM;
RAJU, T. SHANTHA y
SCALLON, BERNARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 543 685 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

Métodos y composiciones con actividad terapéutica mejorada**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION****Campo**

10 La divulgación se refiere a métodos de modificación de proteínas terapéuticas que interactúan con receptores de Fc y que producen proteínas terapéuticas modificadas, por ejemplo, anticuerpos, de forma que la composición de las cadenas de oligosacárido pueda mejorar la avidéz del anticuerpo por su diana y altera la afinidad de unión del receptor y, por tanto, la actividad de función efectora de dichos anticuerpos en comparación con anticuerpos sin modificar.

15 Descripción de la técnica relacionada

Los anticuerpos son glicoproteínas del suero solubles que desempeñan una función significativa en la inmunidad innata. Las estructuras de hidrato de carbono de todos los anticuerpos naturalmente producidos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada varían con el isotipo. Cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de oligosacárido ligadas en N, que afectan variablemente el ensamblaje de proteínas, secreción o actividad funcional (Wright, A., y Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). Con referencia a las Fig. 1 y 2, la estructura de los oligosacáridos ligados en N unidos varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir alta manosa, además de oligosacáridos biantenarios complejos con o sin GlcNAc bisecante y residuos de fucosa central (Wright, A., y Morrison, S. L., arriba). Normalmente, hay procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacárido centrales unidas en un sitio de glicosilación particular, de forma que incluso anticuerpos monoclonales existen como múltiples glicofomas. Asimismo, se ha mostrado que se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares productoras de anticuerpos, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo.

30 El ácido siálico sobre glicanos (grupos estáticos) es conocido por ser importante en prolongar la semivida en suero de glicoproteínas distintas de anticuerpos (Stockert, R. J. (1995) Physiol. Rev. 75, 591-609). Hasta la fecha, la función del ácido siálico sobre anticuerpos monoclonales (mAb) no era bien entendida. La semivida en suero de los mAb es particularmente de larga duración y la construcción de proteínas de fusión de Fc ha demostrado ser una estrategia útil en el desarrollo de proteínas terapéuticas, por ejemplo, la proteína entercept.

35 Los anticuerpos y moléculas receptoras de linfocitos T poseen regiones que son responsables de la unión de receptores de la superficie celular específicos, unión que modula la respuesta celular. En el sistema inmunitario, estas funciones se clasifican como humorales y celulares. Los anticuerpos se denominan frecuentemente moléculas adaptadoras que enlazan mecanismos inmunitarios humorales y celulares: respuestas humorales que se atribuyen principalmente a anticuerpos circulantes secretados maduros capaces de alta unión por afinidad a un antígeno diana. Las respuestas celulares se atribuyen a las consecuencias de la activación celular por la unión de complejos de ab-ag y por secuelas en la dirección 3' producidas por la liberación de mediadores celulares como resultado de la unión del complejo de ab-ag a células efectoras. Estas respuestas celulares incluyen neutralización de diana, opsonización y sensibilización (si el antígeno se expresa sobre la superficie de una célula), sensibilización de mastocitos y activación del complemento. Para dianas celulares, es decir, antígenos de superficie celular, estas funciones efectoras conducen a lo que comúnmente se conoce como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

50 Entre los isotipos de anticuerpos (por ejemplo, IgE, IgD, IgA, IgM e IgG), las IgG son las más abundantes, presentando las subclases de IgG1 el grado más significativo y matriz de funciones efectoras. Los anticuerpos de tipo IgG1 son los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia del cáncer en la que la actividad de ADCC y CDC se consideran frecuentemente importantes. Estructuralmente, la región bisagra y los dominios CH2 de IgG desempeñan una función importante en las funciones efectoras del anticuerpo. Los oligosacáridos ligados en N presentes en la región Fc (formados por la dimerización de la bisagra, dominios CH2 y CH3) afectan las funciones efectoras. Los oligosacáridos covalentemente unidos son estructuras de tipo biantenarias complejas y son altamente heterogéneas (véanse las Figs. 1 y 2). Un sitio de glicosilación ligado en N conservado en Asn297 se encuentra en cada dominio CH2. En el anticuerpo maduro, los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos en Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando amplios contactos con el esqueleto del polipéptido. Se ha encontrado que su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como ADCC (Lifely, M. R., et al., Glycobiology 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., arriba).

65 Estos oligosacáridos heterogéneos contienen predominantemente residuos de ácido siálico, fucosa, galactosa y GlcNAc como azúcares terminales (Raju, T.S., et al., Glycobiology 2000. 10(5): 477-86). Se ha mostrado que algunos de estos azúcares terminales, tales como los residuos de galactosa expuesta, fucosa de núcleo y GlcNAc bisecante, afectan la actividad de ADCC, actividad de CDC, y también afectan la unión del anticuerpo a diversos

ligandos que incluyen la proteína del complemento C1q (Presta L. 2003. Curr Opin Struct Biol. 13(4):519-25). Aunque la mayoría de los oligosacáridos ligados en N que están presentes en Fc son de naturaleza biantenaria compleja, no están sialilados a un grado significativo (Idusogie EE, et al., 2000. J Immunol. 15:164(8):4178-84).

5 Las principales estructuras encontradas en la IgG humana y otras IgG recombinantemente producidas son las estructuras biantenarias complejas con o sin residuos de Gal expuestos (Fig. 1). Se ha estudiado en detalle la significancia biológica de las estructuras que contienen Gal terminal sobre las funciones del anticuerpo. El grado de galactosilación de los anticuerpos está afectado por la edad, sexo y enfermedad (Raju, T.S., et al., Glycobiology 2000. 10(5): 477-86). En general, las estructuras de los oligosacáridos son algo específicas de especie y varían
10 ampliamente. Además, también se ha estudiado la significancia biológica de las estructuras de oligosacáridos con y sin residuos de GlcNAc bisecante y de fucosa de núcleo. La IgG humana y muchas de las IgG recombinantemente producidas contienen cantidades menores de oligosacáridos sialilados, sin embargo, la gran mayoría de las IgG contienen estructuras de oligosacárido no sialilado.

15 La información sobre los efectos del ácido siálico en el glicano de Fc de Ab sobre la función de Fc ha sido limitada, debido parcialmente a la falta de disponibilidad de pares de los mismos mAb de base que se diferencian significativamente en el contenido de ácido siálico. Se informó que la eliminación del ácido siálico de la IgG anticancerígena Campath-1H no tenía efecto sobre la actividad de ADCC, pero pareció que los glicanos de Fc sobre la preparación de mAb original que se usó como referencia estaban menos del 10 % sialilados, dificultando detectar
20 cualquier efecto (Boyd et al., 1995). Similarmente, Wright y Morrison (1998) informaron de diferencia no discernible en la unión de Fc γ RI entre un Ab IgG1 expresado en una línea celular CHO mutante que era defectuosa en la sialilación y el mismo Ab expresado en una línea celular CHO no mutante. Sin embargo, la cantidad de ácido siálico presente en el Ab de células no mutantes fue probablemente bastante bajo (Wright et al., 2000) y, por tanto, cualquier diferencia en la unión entre Ab sialilados y asialilados también sería difícil de detectar. Mimura et al., (2000)
25 compararon la actividad de Fc de Ab IgG1-Fc y IgG1 nativos (heterogéneos) en comparación con el mismo material después del tratamiento con tanto sialidasa como beta-galactosidasa, pero no trataron con sialidasa sola, que hubiera permitido un análisis de los efectos del ácido siálico. Un Ab IgG3 humano mutado y altamente sialilado (mediante enlace α 2,3) (Lund et al., 1996 arriba) fue 2 a 3 veces menos activo que su homólogo de baja sialilación no mutante en ensayos de lisis del complemento, y ensayos funcionales dependientes de Fc γ RI y dependientes de
30 Fc γ RII, pero una variante altamente sialilada del mismo Ab que contuvo una mezcla de dos enlaces de ácido siálico (α 2,3 y α 2,6) mostró actividades comparables al no mutante (Jassal et al., 2001 Biochem Biophys Res Comm 286:243-249). Aunque se demuestra que el tipo de enlace de ácido siálico puede tener al menos algún efecto sobre la función de Fc de un Ab IgG3 de mutante, los estudios no han comparado la función de Fc de una IgG con alto contenido de ácido siálico con una IgG con bajo contenido de ácido siálico.

35 Por tanto, se garantiza un análisis sistemático de la función de composiciones de ácido siálico en estructuras de oligosacárido unidas a regiones constantes de inmunoglobulina. Dadas las técnicas disponibles de ingeniería genética pre-expresión o modificación post-expresión de anticuerpos terapéuticos, esta información puede usarse para mejorar y adicionalmente hacer coincidir las respuestas celulares provocadas por esta clase de bioproductos farmacéuticos con la diana primaria e indicación de enfermedad por llegar.

El documento WO 99/54342 desvela la ingeniería de glicosilación de proteínas. Jassal R et al., (2001) Biochemical and Biophysical Research Communications 286(2):243-9 desvela la sialilación de hidratos de carbono de IgG-Fc humana. Suen KF et al., (2010) Protein Expression and Purification 71(1):96-102 desvela la expresión transitoria de
45 una proteína de fusión de Fc del dominio extracelular de IL-23R en células CHO en comparación con HEK. Kumpel BM et al., (1994) Human Antibodies and Hybridomas 5(3-4):143-151 desvela la galactosilación de IgG humana monoclonal anti-D producida por líneas celulares y B-linfoblastoides transformadas por VEB.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 La presente invención proporciona un método *in vitro* para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc, que comprende alterar la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc en la glicofoma sialilada G2S2, en el que la sialilación aumenta en la región Fc, en el que la sialilación se altera de la región Fc no mutante por tratamiento enzimático o modificación enzimática de la molécula por una α -(2,3)-sialiltransferasa, y en el que las
55 propiedades controladas están seleccionadas del grupo que consiste en afinidad por uno o más de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad de ADCC, activación de macrófagos o monocitos, semivida en suero y avidez.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para controlar las propiedades de una proteína terapéutica que contiene Fc caracterizada por tener un oligosacárido biantenario covalentemente unido a un residuo
60 de asparagina en el dominio CH2 de inmunoglobulina de dicha proteína, que comprende convertir una proteína terapéutica que contiene Fc no de la glicofoma G2S2 en un oligosacárido que es de la glicofoma sialilada G2S2, en el que la etapa de conversión comprende usar una α -(2,3)-sialiltransferasa para añadir residuos de ácido siálico, y en el que dicha proteína que contiene Fc tiene una o más de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en afinidad reducida por Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad reducida en ensayos de ADCC mediados por linfocitos NK,
65 afinidad mejorada por Fc γ RI, capacidad mejorada para activar macrófagos y semivida en suero más corta en

comparación con la misma proteína terapéutica que contiene Fc no de la glicoforma G2S2.

La presente invención también proporciona una proteína terapéutica que contiene Fc caracterizada por tener un oligosacárido biantenarico covalentemente unido a un residuo de asparagina en el dominio CH2 de inmunoglobulina de dicha proteína que es de la glicoforma sialilada de α -(2,3) G2S2, en la que dicha proteína que contiene Fc tiene afinidad reducida por Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad reducida en ensayos de ADCC mediados por linfocitos NK, afinidad mejorada por Fc γ RI, capacidad mejorada para activar macrófagos y semivida en suero más corta en comparación con una preparación de la misma proteína terapéutica que contiene Fc en las glicoformas G0, G1 o G2 no sialiladas.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para preparar un lote de proteína recombinante terapéutica que contiene Fc de la glicoforma sialilada G2S2 caracterizada por comprender un dominio de isotipo IgG de inmunoglobulina de al menos una región bisagra, dominio CH2 y CH3, en el que el método comprende tratar el lote con una enzima α -(2,3)-sialiltransferasa para añadir residuos de ácido siálico a las cadenas de polisacárido unidas a dicha proteína.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para controlar una afinidad de unión por una diana de una molécula que contiene Fc que tiene un dominio de unión específico para la diana, que comprende alterar la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc en la glicoforma sialilada G2S2, en el que la sialilación aumenta en la región Fc y la avidéz disminuye, y en el que la sialilación se altera de la región Fc no mutante por tratamiento enzimático o modificación enzimática de la molécula con una α -(2,3)-sialiltransferasa.

La presente divulgación comprende métodos para optimizar las funciones inmunitarias humorales y celulares de moléculas que contienen Fc, particularmente productos terapéuticos de anticuerpo.

La presente divulgación comprende un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc, que comprende alterar (aumentar o reducir a partir de no mutante) la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc para controlar la avidéz de la molécula para proteínas diana múltiplemente localizadas; la afinidad por uno o más de los receptores de Fc gamma, por ejemplo, receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA; actividad de ADCC; activación de macrófagos o monocitos; y semivida en suero.

La sialilación de glicanos puede alterarse por tratamiento enzimático, modificación enzimática de la molécula, manipulación genética de la molécula, cromatografía de lectina, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, selección específica o ingeniería genética de la línea celular usada para la expresión de la proteína, cultivar células huésped usadas para producir la proteína que contiene Fc en suero o en un medio que contiene enzimas capaces de modificaciones de oligosacáridos o inhibidores de tales enzimas, y exponer la proteína a un entorno de pH variado.

La divulgación también se refiere a la preparación de lotes altamente homogéneos de anticuerpos que contienen oligosacáridos ligados en N máximamente sialilados en el dominio Fc. Se refiere además a la purificación de lotes de anticuerpos enriquecidos para anticuerpos que contienen ácido siálico en el oligosacárido de Fc, además de anticuerpos que no contienen ácido siálico en el oligosacárido de Fc.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método de manipulación de la actividad de glicosiltransferasa (sialiltransferasa) *in vitro*, con el fin de afectar el nivel de sialilación del anticuerpo monoclonal recombinantemente expresado resultante u otra proteína que contiene Fc de fusión y cuyo método hace que la proteína recombinantemente expresada resultante tenga (i) funciones efectoras mediadas por Fc, (ii) unión a receptor de Fc γ , (iii) ADCC alterada, (iv) semivida en suero en comparación con el polipéptido que contiene Fc recombinantemente expresado no optimizado para el contenido de ácido siálico o (v) avidéz por moléculas diana expresadas en una matriz natural o sintética apropiadamente optimizada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DEL DIBUJO

La **Fig. 1** es una representación esquemática de la estructura de oligosacárido más grande encontrada en IgG humana.

La **Fig. 2** representa las principales estructuras de oligosacárido encontradas en una IgG recombinante producida en células de ovario de hámster chino (CHO).

La **Fig. 3** muestra los resultados de un análisis de HPLC de oligosacáridos de Fc. Los oligosacáridos ligados en N se liberaron primero del anticuerpo tratando con enzima PNGasa F. Los oligosacáridos liberados se marcaron con ácido antranílico y los oligosacáridos marcados se purificaron por cromatografía por filtración en gel. Los oligosacáridos marcados purificados se analizaron por HPLC, produciendo el cromatograma mostrado.

Las **Figs. 4A y 4B** son gráficos que muestran la unión de diferentes complejos inmunitarios de Ab1:TNF a Fc γ RII humano sobre células K562 por dos formatos diferentes. (A) Unión por competición medida añadiendo cantidades variables de complejos sin marcar de Ab1 y TNF a las células en presencia de una cantidad fija del Ab5 IgG1 humano marcado con ¹²⁵I complejoado con Ab6, un Ab monoclonal de ratón específico para Ab5. (B) Unión directa

medida añadiendo a las células K562 cantidades variables de Ab1 complejo con TNF marcado con ¹²⁵I.

Las **Figs. 5A-D** son gráficos de estudios de unión de FcγRIIIa con diversas preparaciones de Ab de prueba usados para que el mAb anti-FcγRIIIa radiomarcado 3G8 a una concentración fija compita por la unión a FcγRIIIa de linfocitos NK: variantes de glicosilación natural de Ab1 (A); variantes de glicosilación natural de Ab5 (B); fracciones de columna de lectina de Ab1 (C); y fracciones de columna de lectina de Ab2 (D).

Las **Figs. 6A-D** son gráficos que muestran resultados de los ensayos de ADCC *in vitro* realizados usando Ab1 que se diferencian en el contenido de ácido siálico, células diana K2 que expresan en exceso TNF sobre su superficie celular y células efectoras PBMC humanas que expresan FcγR. (A) Variantes de glicosilación natural de Ab1, (B) variantes de glicosilación natural de Ab5, (C) comparación de tres sublotos de Ab1 que se diferencian en el contenido de ácido siálico tras el fraccionamiento basado en afinidad de lectina WGA, y Ab1 enzimáticamente desglucosilado (Gno), (D) comparación de una muestra de Ab1 sin tratar y una muestra de G2S2 de Ab1 completamente sialilada, o Ab de control negativo del mismo isotipo Ab7. Las muestras se analizaron por triplicado (las barras de error representan d.e.) y los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes para cada par de variantes. La diferencia en la actividad entre estas muestras de prueba fue significativa ($P < 0,0001$ para los gráficos A, C y D; $P = 0,0016$ para el gráfico B) como se ha determinado por prueba F de la suma de cuadrados extra.

Las **Figs. 7A y B** son gráficos que muestran la unión competitiva de diversas muestras de anticuerpos de IgG por el receptor FcγRI humano (CD64) sobre células U-937. (A) G2 de Ab1 (completamente galactosilado y sin sialilar) y G2S2(hi) de Ab1 (completamente galactosilado y completamente sialilado) se diferencian solo por la ausencia y presencia de ácido siálico, (B) dos lotes diferentes de Ab3 se diferencian en la cantidad de especies de oligosacáridos cargados (especies que contienen ácido siálico), que es tanto el 2 % como el 42 % del oligosacárido total.

La **Fig. 8** es una gráfica que muestra la relación entre el tiempo después de la administración y la concentración en suero de la porción Fc de una proteína de fusión (FcP1) que se había sialilado completamente (G2S2) o sin modificar.

La **Fig. 9** es una gráfica que muestra la relación entre el tiempo después de la administración y la concentración en suero de la porción Fc de un Ab2 G2S2 completamente sialilado o Ab2 G2 completamente asialilado, por métodos enzimáticos como se describe.

La **Fig. 10A-D** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en preparaciones de Ab sobre la afinidad por ligando diana sobre la superficie celular por unión competitiva con Ab radiomarcado: (A) variantes naturales de Ab1, (b) variantes naturales de Ab5, (C) variantes de la fracción de columna de lectina de Ab1 y (D) variantes de la fracción de columna de lectina de Ab2. Las muestras se probaron por duplicado o cuadruplicado, y los resultados mostrados son representativos de 3 ó 4 experimentos independientes. La diferencia en la unión entre estas muestras de prueba fue significativa ($P < 0,0001$ para los gráficos A, C y D) como se ha determinado por la prueba F de la suma de cuadrados extra.

La **Fig. 11A-B** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en preparaciones de Ab sobre la afinidad por ligando diana sobre placas de EIA: (A) variantes naturales de Ab1 que se unen a TNF, (B) unión de Ab2 a un anticuerpo anti-Ig.

La **Fig. 12A-C** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en preparaciones de Ab sobre la afinidad por ligando diana presentado como antígeno soluble radiomarcado al Ab unido a la superficie: (A) variantes naturales de Ab1, (B) variantes de la fracción de columna de lectina de Ab1 y (C) variantes de la fracción de columna de lectina de Ab2. Se hicieron incubaciones en paralelo con Ag radiomarcado y exceso de 100 veces de Ag sin marcar para determinar la unión no específica. Las muestras se probaron por triplicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Abreviaturas

α 1,3GT, α -1,3-galactosiltransferasa; α 2,3ST, α -2,3-sialiltransferasa; β 1,4GT, β -1,4-galactosiltransferasa; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo; ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; BATDA, bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-y"-dicarboxilato; BSA, albúmina de suero bovino; medio CD, medio de cultivo químicamente definido; CDC, citotoxicidad dirigida por el complemento; CMP-Sia, citidina monofosfato del ácido *N*-acetilneuramínico; DMEM, medio Eagle modificado con Dulbecco; E:T, relación de células efectoras con respecto a células diana; FBS, suero bovino fetal; ESI-MS, espectrometría de masas de ionización por electropulverización; linfocitos NK, linfocitos citolíticos espontáneos; IgG, inmunoglobulina G; IMDM, medio Dulbecco modificado con Iscove; EM MALDI-TOF, espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización/desorción láser asistida por matriz; MHX, ácido micofenólico, hipoxantina, xantina; NANA, isómero de ácido *N*-acetilneuramínico del ácido siálico; NGNA, isómero de ácido *N*-glicolilneuramínico del ácido siálico; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PBMC, célula mononuclear de sangre periférica; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PNGasa F, péptido *N*-glicosidasa F; RP-HPLC, cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa; TA, temperatura ambiente; Sia, ácido siálico; UDP-Gal, uridina difosfato galactosa; UDP-GlcNAc, uridina difosfato *N*-acetilglucosamina.

Definiciones

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, pretende ser una medida de la constante de unión de

un único ligando monovalente por su componente de unión relacionado, por ejemplo, la unión de un Fab' por un antígeno o epítipo. La afinidad puede medirse de varias formas que incluyen, sin embargo, medir constantes de asociación y disociación (k_{as} y k_{dis} , respectivamente) por, por ejemplo, resonancia de plasmones (BiaCore) y expresarlas como constante de asociación global (K_{as}) o de disociación (K_D) en la que K_{as} es k_{as}/k_{dis} y K_D es k_{dis}/k_{as} . K_D también puede medirse empíricamente, por ejemplo, midiendo la concentración a la que la unión del ligando a un componente de unión se satura a la mitad. Otro método de medir K_D es por ensayo de competición, en el que un ligante o ligando se marca o etiqueta y se mantiene a una concentración constante mientras que el ligante de prueba o ligando se añade a concentraciones variables para competir con la sustancia marcada de su componente de unión relacionado y determinar la concentración a la que marca se disminuye a la mitad.

El término "avidez", como se usa en el presente documento, pretende ser una medida de la tendencia de un ligando a seguir unido a un componente de unión en tanto que tanto el ligando como el componente de unión puedan ser multivalentes y la tendencia para múltiples eventos de asociación y disociación pueda producirse simultáneamente para un ligando específico. Así, la avidez puede estimarse por un aumento en la afinidad aparente de conformaciones multivalentes de un componente de unión con una afinidad conocida.

El término "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína monómera, dímera o heterodímera que tiene un dominio de unión del ligando y al menos un dominio CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dímera de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

El término "anticuerpo" pretende englobar anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de los mismos, que incluyen, sin limitación, miméticos de anticuerpo o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o porción del mismo, y retienen las funciones mediadas por Fc, que incluyen, pero no se limitan a: unión a receptores de Fc (por ejemplo, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIIA (CD16A) y FcRn), unión al complemento (por ejemplo, C1q), ADCC y CDC.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, es una forma específica de proteína de fusión que contiene Fc en el que el dominio de unión del ligando retiene homología sustancial con al menos uno de un dominio variable de anticuerpo de la cadena pesada o ligera de al menos una especie de anticuerpo de animal.

El término "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico I (frecuentemente abreviado como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (NGNA, Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Esta forma es prevalente en glicoproteínas de fuentes de roedor y microbianas. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxinonulosónico (KDN) (Nadano et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en 9 tales como un 9-O-acil C1-C6-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer Verlag, New York (1992)).

Descripción

Se encontró inesperadamente que el nivel de sialilación de los oligosacáridos de Fc altera la afinidad de anticuerpos terapéuticos recombinantemente producidos por receptores de Fc γ , produciendo la modulación de diversos aspectos de las acciones biológicas de dichos anticuerpos. Más específicamente, se descubrió que los Ab altamente sialilados tienen afinidad significativamente reducida por los receptores de baja afinidad, Fc γ RIIA (CD32A) y Fc γ RIIIA (CD16A), y tienen actividad significativamente reducida en ensayos de ADCC *in vitro* en los que Fc γ RIIIA se cree que es el receptor relevante. Se descubrió adicionalmente que los Ab altamente sialilados tienen elevada afinidad por el receptor de Fc γ de alta afinidad, Fc γ RI (CD64), y que las proteínas que contienen Fc completamente sialiladas tienen semivida en suero reducida en comparación con proteínas que contienen Fc asialiladas o parcialmente sialiladas.

Se descubrió adicionalmente que la eliminación (o la ausencia o niveles reducidos) de ácido siálico de los oligosacáridos de Fc mejora la avidez de anticuerpos terapéuticos recombinantemente producidos por su molécula diana. Aunque no se desee quedar ligado a teoría alguna, la eliminación del grupo siálico cargado del oligosacárido puede interpretarse como que permite más flexibilidad en la estructura de anticuerpo global, flexibilidad que confiere una esfera agrandada de posible interacción para los dos dominios de unión en relación entre sí. La capacidad de un Ab para unirse bivalentemente a dos epítopes de antígeno también dependerá de la accesibilidad del epítipo, orientación, densidad y movilidad. Debe observarse que el efecto de unión al antígeno de la sialilación también puede ser relevante para Ab que reconocen antígenos de superficie virales o bacterianos, e incluso antígenos solubles que son homopolímeros, ya que la flexibilidad del Ab puede determinar a qué grado moléculas de Ab individuales se unen bivalentemente dentro de un complejo inmunitario soluble, en el que no solo podrían algunos de los Ab unirse a más de un antígeno, sino que algunos de los antígenos pueden unirse por más de un Ab.

La presente divulgación comprende un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc alterando la sialilación de los oligosacáridos de Fc y las moléculas que contienen Fc alteradas. El ácido siálico tiene una carga negativa neta a pH fisiológico y, así, podría esperarse que la presencia de ácido siálico en el hidrato de carbono unido a Fc alterara la estructura tridimensional y, por tanto, la conformación del dominio CH2 y así afectara la unión de Fc a diversos ligandos o receptores. La molécula que contiene Fc alterada afecta la afinidad por uno o más de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad de ADCC, activación de macrófagos o monocitos, y semivida en suero.

Enriquecimiento de formas sialiladas de proteínas que contienen Fc

Un enfoque para preparar sublotos de una proteína que contiene Fc particular que se diferencia en contenido de ácido siálico es tomar una preparación de proteína que contiene Fc con oligosacáridos de Fc heterogéneos, que incluye tanto moléculas sialiladas como asialiladas, y pasarla sobre una columna que contiene una lectina inmovilizada que tiene afinidad diferencial por oligosacáridos sialilados y asialilados. El flujo a través de no unión (T, a través) o la fracción sin unir en la columna puede separarse de la fracción unida (B, unida), la última se recoge mientras que se pasa tampón de elución a través de la columna. También puede ser posible recoger por separado una fracción débilmente unida o la fracción retardada de la columna (R, retardada), por ejemplo, recogiendo proteína que contiene Fc que eluye durante el lavado continuado de la columna con el tampón de muestra original. Dependiendo de la lectina usada, la fracción de no unión puede tener un mayor o menor contenido de ácido siálico que la fracción que se une.

Ejemplos de lectinas que pueden enriquecerse en proteínas que contienen Fc sialiladas o asialiladas son la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que se une específicamente a oligosacáridos con ácido siálico terminal, y la lectina aglutinina de germen de trigo (WGA), que se une específicamente a oligosacáridos con tanto ácido siálico terminal como N-acetilglucosamina terminal (GlcNAc). Otro ejemplo es la lectina ricina I (RCA), que se une a oligosacáridos con galactosa terminal. En el último ejemplo, la fracción de flujo a través que no se une puede enriquecerse en moléculas que contienen Fc sialiladas.

Modificación enzimática de proteínas que contienen Fc

Un enfoque alternativo para preparar sublotos de una proteína que contiene Fc que se diferencia en el contenido de ácido siálico es tratar una porción de una preparación de proteína que contiene Fc con enzima sialidasa, eliminando así ácidos siálicos. El material asialilado resultante puede compararse con el material original, parcialmente sialilado, para diferencias en la actividad biológica. Cuanto mayor sea el contenido de ácido siálico en el lote de proteína que contiene Fc original, mayor será la probabilidad de detectar cualquier diferencia en la actividad biológica. Por ejemplo, si solo el 10 % de los oligosacáridos de Fc en la preparación de proteína contuvieron ácido siálico, puede ser difícil detectar diferencias en la actividad biológica después del tratamiento con sialidasa, cuando el 0-1 % de los oligosacáridos contienen ácido siálico. El comparar la actividad biológica de una proteína que contiene Fc antes y después del tratamiento con sialidasa será más difícil si el tratamiento con sialidasa produce una distribución diferente de oligosacáridos fucosilados y afucosilados, ya que los niveles de fucosa tienen un profundo efecto sobre ciertas actividades biológicas, tales como afinidad por Fc γ RIIIA humano y actividad de ADCC. Por ejemplo, si una reducción del contenido de ácido siálico del 30 % de los oligosacáridos al 0 % hace que la proporción de oligosacáridos afucosilados aumente del 5 % al 15 %, entonces no será posible atribuir diferencias en la actividad de ADCC únicamente a la disminución en el contenido de ácido siálico. Es posible un efecto tal del tratamiento con sialidasa sobre la proporción relativa de oligosacáridos fucosilados y afucosilados (y se ha observado) debido a la diferencia en la sialilación de oligosacáridos fucosilados y afucosilados antes del tratamiento con sialidasa para eliminar residuos de ácido siálico.

La sialilación de oligosacáridos presentes en la región Fc también puede lograrse usando métodos de glicosilación *in vitro*. Usando tales métodos, es posible obtener glicofomas máximamente sialiladas de muestras de anticuerpo. Basándose en el descubrimiento de los solicitantes, glicofomas máximamente sialiladas de anticuerpos u otras construcciones que contienen Fc tendrán semivida en suero reducida en comparación con anticuerpos asialilados o sialilados por defecto. Así, el método de la invención proporciona un medio opcional para controlar tanto la homogeneidad de las glicofomas que comprenden anticuerpo u otras construcciones de proteína recombinante que contienen una región Fc de inmunoglobulina como los aspectos funcionales *in vivo* de dichos anticuerpos o construcciones.

Las glicosiltransferasas funcionan naturalmente sintetizando oligosacáridos. Producen productos específicos con excelente geometría estereoquímica y regioquímica. La transferencia de residuos de glicosilo produce el alargamiento o síntesis de un oligo- o polisacárido. Se han descrito varios tipos de glicosiltransferasa que incluyen sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas.

Las glicosiltransferasas que son útiles en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, α -sialiltransferasas, α -glicosiltransferasas, α -galactosiltransferasas, α -fucosil-transferasas, α -mannosiltransferasas, α -xilosiltransferasas, α -

N-acetilhexosaminiltransferasas, β -sialiltransferasas, β -glicosiltransferasas, β -galactosiltransferasas, β -fucosiltransferasas, β -mannosiltransferasas, β -xilosiltransferasas y β -N-acetilhexosaminiltransferasas, tales como aquellas de *Neisseria meningitidis*, u otras fuentes bacterianas, y aquellas de rata, ratón, conejo, vaca, cerdo, ser humano e insecto y fuentes virales. Preferentemente, la glicosiltransferasa es una enzima glicosiltransferasa de variante de truncación en la que se ha delecionado el dominio de unión a membrana.

Galactosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa (E.C. nº 2.4.1.151, véase, por ejemplo, Dabkowski et al., *Transplant Proc.* 25:2921 (1993) y Yamamoto et al., *Nature* 345:229-233 (1990)) y $\alpha(1,4)$ galactosiltransferasa (E.C. nº 2.4.1.38). Pueden usarse otras glicosiltransferasas, tales como una sialiltransferasa.

Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa, frecuentemente denominada la sialiltransferasa, puede usarse en la producción de sialilactosa o estructuras de orden mayor. Esta enzima transfiere ácido siálico (NeuAc) de CMP-ácido siálico a un residuo de Gal con formación de un enlace α entre los dos sacáridos. La unión (enlace) entre los sacáridos es entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa a modo de ejemplo denominada $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora de un disacárido o glucósido Gal β 1 \rightarrow 3Glc. Véanse, Van den Eijnden et al., *J. Biol. Chem.*, 256:3159 (1981), Weinstein et al., *J. Biol. Chem.*, 257:13845 (1982) y Wen et al., *J. Biol. Chem.*, 267:21011 (1992). Otra α -2,3-sialiltransferasa a modo de ejemplo (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora del disacárido o glucósido. Véase Rearick et al., *J. Biol. Chem.*, 254:4444 (1979) y Gillespie et al., *J. Biol. Chem.*, 267:21004 (1992). Enzimas a modo de ejemplo adicionales incluyen Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (véase, Kurosawa et al., *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

Otras glicosiltransferasas particularmente útiles en la preparación de oligosacáridos de la divulgación son las manosiltransferasas, que incluyen $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa, $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa, $\beta(1,4)$ manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1 y Pmt1.

Todavía otras glicosiltransferasas incluyen N-acetilgalactosaminiltransferasas que incluyen $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferasa, $\beta(1,4)$ N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata et al., *J. Biol. Chem.* 267:12082-12089 (1992) y Smith et al., *J. Biol. Chem.* 269:15162 (1994)) y polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa et al., *J. Biol. Chem.* 268:12609 (1993)). N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.101, Hull et al., *BBRC* 176:608 (1991)), GnTII y GnTIII (Ihara et al., *J. Biochem.* 113:692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al., *J. Biol. Chem.* 268: 15381 (1993)).

Para aquellas realizaciones en las que el método va a ponerse en práctica a escala comercial, puede ser ventajoso inmovilizar la glicosiltransferasa sobre un soporte. Esta inmovilización facilita la eliminación de la enzima del lote de producto y posterior reuso de la enzima. La inmovilización de glicosiltransferasas puede llevarse a cabo, por ejemplo, eliminando de la transferasa su dominio de unión a membrana, y uniendo en su sitio un dominio de unión a celulosa. Un experto en la materia entenderá que también podrían usarse otros métodos de inmovilización y se describen en la bibliografía disponible.

Debido a que los sustratos aceptores pueden ser esencialmente cualquier monosacárido u oligosacárido que tenga un residuo de sacárido terminal por el que la glicosiltransferasa particular presenta especificidad, el sustrato puede estar sustituido en la posición de su extremo no reductor. Así, el aceptor de glucósido puede ser un monosacárido, un oligosacárido, un sacárido marcado fluorescente o un derivado de sacárido, tal como un antibiótico de aminoglucósido, un gangliósido o una glicoproteína que incluye anticuerpos y otras proteínas que contienen Fc. En un grupo de realizaciones preferidas, el aceptor de glucósido es un oligosacárido, preferentemente, Gal $\beta(1-3)$ GlcNAc, Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc, Gal $\beta(1-3)$ GalNAc, Gal $\beta(1-4)$ GalNAc, Man $\alpha(1,3)$ Man, Man $\alpha(1,6)$ Man o GalNAc $\beta(1-4)$ -manosa. En una realización preferida particular, el aceptor de oligosacárido está unido a un dominio CH2 de una proteína que contiene Fc.

El uso de sustrato de azúcar activado, es decir, nucleósido fosfato de azúcar, puede evitarse tanto usando una reacción de regeneración simultáneamente con la reacción de glicotransferasa (también conocida como un sistema de reciclado). Por ejemplo, como se enseña en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.030.815, un sistema de reciclado de CMP-ácido siálico utiliza CMP-ácido siálico sintetasa para reponer CMP-ácido siálico (CMP-NeuAc) a medida que reacciona con un aceptor de sialiltransferasa en presencia de una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa para formar el sialilsacárido. El sistema de regeneración de CMP-ácido siálico útil en la invención comprende citidina monofosfato (CMP), un nucleósido trifosfato (por ejemplo, adenosina trifosfato (ATP), un donante de fosfato (por ejemplo, fosfoenolpiruvato o fosfato de acetilo), una cinasa (por ejemplo, piruvato cinasa o acetato cinasa) que puede transferir fosfato del donante de fosfato a nucleósido difosfatos y una nucleósido monofosfato cinasa (por ejemplo, miocinasa) que puede transferir el fosfato terminal de un nucleósido trifosfato a CMP. La $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa y la CMP-ácido siálico sintetasa también pueden visualizarse como parte del sistema de regeneración de CMP-ácido siálico, ya que la eliminación del ácido siálico activado sirve para mantener la velocidad de avance de la síntesis. La síntesis y uso de los compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación usando un fagémido que comprende un gen para una enzima CMP-ácido siálico sintetasa modificada se desvela en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

Un método alternativo de preparación de oligosacáridos es mediante el uso de una glicosiltransferasa y derivados de glicosilo activados como azúcares donantes que obvian la necesidad de nucleótidos de azúcar como azúcares donantes como se enseña en la patente de EE.UU. 5.952.203. Los derivados de glicosilo activados actúan de alternativas a los sustratos que se producen naturalmente, que son nucleótidos de azúcar caros, normalmente nucleótido difosfoazúcares o nucleótido monofosfoazúcares en los que el nucleótido fosfato está ligado en α a la posición 1 del azúcar.

Los derivados de glucósido activados que son útiles incluyen un grupo saliente activado, tal como, por ejemplo, flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato. Realizaciones preferidas de derivados de glucósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, siendo los fluoruros de glicosilo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo, el fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glicosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de alfa-N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glicosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de beta-sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo son los más preferidos.

Los fluoruros de glicosilo pueden prepararse a partir del azúcar libre acetilando primero el azúcar y luego tratándolo con HF/piridina. Los fluoruros de glicosilo acetilados pueden desprotegerse mediante reacción con base suave (catalítica) en metanol (por ejemplo, NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están comercialmente disponibles. Otros derivados de glicosilo activados pueden prepararse usando métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse mesilatos de glicosilo por tratamiento de la forma de hemiacetal completamente bencilada del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

Otro componente de la reacción es una cantidad catalítica de un nucleósido fosfato o análogo del mismo. Nucleósido monofosfatos que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, adenosina monofosfato (AMP), citidina monofosfato (CMP), uridina monofosfato (UMP), guanosina monofosfato (GMP), inosina monofosfato (IMP) y timidina monofosfato (TMP). Nucleósido trifosfatos adecuados para su uso según la presente invención incluyen adenosina trifosfato (ATP), citidina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP), guanosina trifosfato (GTP), inosina trifosfato (ITP) y timidina trifosfato (TTP). Un nucleósido trifosfato preferido es UTP. Preferentemente, el nucleósido fosfato es un nucleósido difosfato, por ejemplo, adenosina difosfato (ADP), citidina difosfato (CDP), uridina difosfato (UDP), guanosina difosfato (GDP), inosina difosfato (IDP) y timidina difosfato (TDP). Un nucleósido difosfato preferido es UDP. Como se observa anteriormente, la presente invención también puede ponerse en práctica con un análogo de los nucleósido fosfatos. Análogos adecuados incluyen, por ejemplo, nucleósido sulfatos y sulfonatos. Todavía otros análogos incluyen fosfatos simples, por ejemplo, pirofosfato.

Un procedimiento para modificar proteínas recombinantes producidas en, por ejemplo, células murinas en las que la forma hidroxilada de ácido siálico (NGNA) predomina, es tratar la proteína con sialidasa, para eliminar ácido siálico de tipo NGNA, seguido de galactosilación enzimática usando el reactivo UDP-Gal y beta1,4 Galtransferasa para producir glicofomas G2 altamente homogéneas. La preparación puede entonces, opcionalmente, tratarse con el reactivo CMP-NANA y alfa-2,3-sialiltransferasa para dar glicofomas G2S2 altamente homogéneas.

Caracterización estructural de variantes de ácido siálico

Para la caracterización estructural de variantes de ácido siálico que contienen oligosacáridos, las preparaciones de glicoproteína que incluyen preparaciones de anticuerpo se trataron con péptido-N-glicosidasa F para liberar los oligosacáridos ligados en N. La enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) escinde oligosacáridos ligados a asparaginas. Los oligosacáridos liberados se marcaron fluorescentemente con ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico), se purificaron y se analizaron por HPLC como se ha descrito (véase Anumula, K. R. y Dhume ST Glycobiology. 1998 Jul;8(7):685-94). Como se muestra en la Figura 3, los oligosacáridos separados como G0, G1, G2, G2S1 y G2S2 en el cromatograma pueden detectarse y cuantificarse. Especies aglicosiladas, que naturalmente carecen de glicanos o que se han despojado químicamente o enzimáticamente de glicano, se designan Gno.

Caracterización biológica de variantes de ácido siálico

Las proteínas que contienen Fc pueden compararse para funcionalidad por varios ensayos muy conocidos *in vitro*. En particular, la afinidad por miembros de la familia Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII de receptores de Fc γ es de interés. Estas mediciones podrían hacerse usando formas solubles recombinantes de los receptores o formas asociadas a célula de los receptores. Además, la afinidad por FcRn, el receptor responsable de la prolongada semivida circulante de IgG, puede medirse, por ejemplo, por BIAcore usando FcRn soluble recombinante. Los ensayos funcionales basados en células, tales como ensayos de ADCC y ensayos de CDC, proporcionan un conocimiento de las consecuencias probablemente funcionales de estructuras de variante particulares. En una realización, el ensayo de ADCC está configurado hacer que las células NK actúen de célula efectora primaria, reflejando así los efectos funcionales sobre el receptor Fc γ RIIIA. También pueden usarse ensayos de fagocitosis para comparar funciones efectoras inmunitarias de diferentes variantes, como pueden ser ensayos que miden respuestas celulares, tales como superóxido o la

liberación de mediadores inflamatorios.

Ensayos de afinidad y avidéz

5 Los anticuerpos, que son naturalmente multivalentes, pueden probarse para determinar diversos parámetros de unión a proteínas diana. Un formato conveniente para determinar una K_d aparente es el ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) o RIA (radioinmunoensayo). El "ELISA" se ha usado generalmente para indicar un ensayo de unión realizado sobre un soporte sólido usando métodos de detección indirectos. Generalmente, en un ELISA, analitos solubles se eliminan de la disolución después de unirse específicamente a reactantes en fase sólida.
 10 En el método, reactantes en fase sólida se preparan adsorbiendo un antígeno o anticuerpo sobre placas de microtitulación de plástico; en otros métodos, los reactantes en fase sólida son moléculas asociadas a la célula. En todos los protocolos, los reactivos en fase sólida se incuban con reactantes secundarios o terciarios covalentemente acoplados a una enzima. Los conjugados sin unir se eliminan lavando y se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico. A medida que el sustrato se hidroliza por el conjugado de enzima unido, se genera un producto coloreado o fluorescente. Finalmente, el producto se detecta visualmente o con un lector de placas de microtitulación. La intensidad de la señal generada es proporcional a la cantidad de analito inicial en la mezcla de prueba.

20 En una variación del ensayo en fase sólida, un antígeno puede inmovilizarse indirectamente o capturarse, por ejemplo, usando un anticuerpo de captura inmovilizado que reconoce un dominio irrelevante sobre el antígeno o usando un anticuerpo u otro ligando que se une a una "marca" manipulada en la proteína diana, por ejemplo, una secuencia de polihistidina.

25 Un método alternativo de medición de la unión de anticuerpos contra antígenos de superficie es usando células completas que expresan (naturalmente o mediante ingeniería genética) un antígeno sobre la superficie celular. Las células se incuban con una disolución de prueba que contiene el anticuerpo primario. El anticuerpo sin unir se lava y las células se incuban entonces con una enzima conjugada con anticuerpos específicos para el anticuerpo primario. El conjugado de enzima sin unir se lava y se añade disolución de sustrato. El nivel de anticuerpo primario unido es proporcional a la cantidad de hidrólisis del sustrato. Esta será cuantitativa si el número de células por unidad de volumen se mantiene constante. Alternativamente, la detección puede hacerse usando un ligando radiomarcado mediante la unión directa o competición como se ha descrito anteriormente. Protocolos para ensayos de ELISA se encuentran, por ejemplo, en: Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular Biology. 2003 John Wiley & Sons, Inc.

35 Las constantes de unión, constantes de asociación y constantes de disociación también pueden medirse usando tecnología BIAcore que usa un ligante en fase sólida o ligando y un ligante en fase de disolución móvil o ligando detectado por resonancia de plasmones superficiales.

Métodos para evaluar la función efectora

40 La función de glicosilación de los anticuerpos en la eliminación y, por tanto, la farmacocinética de proteínas que contienen Fc terapéuticas parece mínima; la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), aunque responsable de la eliminación de IgG de la circulación, parece inalterada por una falta oligosacárido ligado en N sobre la porción Fc de un anticuerpo.

45 Los receptores de Fc de IgG (FcR) que se unen a respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpo IgG con funciones efectoras celulares incluyen los receptores Fc-gamma: FcRI (CD64), FcRII (CD32) (tanto FcRIIA como FcRIIB) y FcRIII (CD16). Los tres se encuentran expresados sobre monocitos. Sin embargo, la elaboración de estos receptores sobre diversas células diana parece producirse diferencialmente y en respuesta a otros factores. Por tanto, la medición de la afinidad de agentes bioterapéuticos que contienen Fc modificados por glicosilación para receptores de Fc-gamma es una medición apropiada para predecir funciones efectoras mejoradas.

50 Se ha informado que los Ab IgG1 humanos con bajos niveles de fucosa en sus glicanos de Fc tienen mayor afinidad por FcR de CD16 humano y actividad espectacularmente mejorada *in vitro* en ensayos de ADCC usando células efectoras PBMC humanas (Shinkawa et al., J Biol Chem 278(5):3466-3473, 2003; Shields et al., J Biol Chem 277(30):26733-26740, 2002; Umana et al., Nat Biotech 17:176-180,1999).

55 Un método de evaluación de las funciones efectoras usando el ensayo de ADCC *in vitro* puede realizarse de una manera cuantitativa. Así, puede diseñarse un ensayo *in vitro* para medir la capacidad de anticuerpo unido para producir la destrucción de la célula que expresa su ligando relacionado por la correcta selección de diana y líneas celulares efectoras y evaluar la "destrucción" de células por tanto la incapacidad de las células para continuar dividiéndose como por la liberación de contenidos internos, por ejemplo, liberación de ⁵¹Cr. La célula diana puede ser una línea celular que normalmente expresa un ligando diana para el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de la invención o puede manipularse para expresar y retener la proteína diana sobre su superficie.
 60 Un ejemplo de una línea celular manipula tal es la célula K2, una línea de células de mieloma de ratón Sp2/0 que expresa establemente sobre su superficie TNF humano recombinante que permanece como una forma
 65

transmembranaria debido a la introducción de una delección de aminoácidos 1-12 de la citocina madura (Perez et al., Cell 63:251-258, 1990). Esta línea celular es útil para evaluar alteraciones en la actividad de ADCC de anticuerpos anti-TNF, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión dirigidas a anti-TNFalfa manipuladas que tienen dominios Fc o actividad de dominios Fc.

Las células efectoras para el ensayo de actividad de ADCC *in vitro* pueden ser PBMC (células monocíticas de sangre periférica) de fuente humana u otra fuente de mamífero. Las células efectoras PBMC pueden aislarse poco después de recoger la sangre de donantes por métodos aprobados. Otras células monocíticas o de macrófago que pueden usarse son aquellas de fluidos derivados de efusión tales como exudados peritoneales.

También están disponibles modelos *in vivo* para medir las funciones inmunitarias celulares. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de linfocitos T en ratones, debido a que la activación de linfocitos T depende del modo en el que el dominio Fc del anticuerpo interacciona con receptores de Fc γ específicos. *In vitro*, se comparó la actividad antitumoral de una versión de alta fucosa y una de baja fucosa de un Ab IgG1 humano quimérico contra el receptor 4 de quimiocinas CC, no se observó diferencia en su actividad de ADCC *in vitro* (usando células efectoras de ratón); sin embargo, el Ab de baja fucosa mostró eficacia más potente *in vivo*. No se proporcionaron células efectoras humanas y los ratones retienen linfocitos NK endógenos (Niwa et al., Cancer Res 64:2127-2133, 2004). Como el receptor de CD16 sobre linfocitos NK humanos ha demostrado sensibilidad mejorada a niveles de fucosa de Ab IgG1, estos datos sugieren que un mecanismo distinto del que se ha estudiado en células efectoras humanas está operando en ratones. Una posibilidad es el receptor CD16-2 de ratón más recientemente descubierto (Mechetina et al., Immunogen 54:463-468, 2002). El dominio extracelular de CD16-2 de ratón tiene significativamente mayor identidad de secuencias con CD16A humano (65 %) que el receptor CD16 de ratón mejor conocido, sugiriendo que puede ser más sensible a niveles de fucosa de IgG con las que se une que CD16 de ratón. Su expresión informada en células J774 tipo macrófago de ratón está de acuerdo con la posibilidad de que los macrófagos de ratón que expresan CD16-2 puedan ser responsables de la mayor actividad antitumoral por el Ab de baja fucosa descrito por Niwa et al., (2004). Así, el estudio de la unión del receptor de Fc por proteínas que contienen Fc tipo IgG1 humana a células efectoras murinas no es predictivo.

Procesos de producción de proteínas

Diferentes procesos que participan en la producción de proteínas que contienen Fc pueden afectar la estructura de oligosacáridos de Fc, que incluyen ácido siálico. En una realización, las células huésped que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan en presencia de suero, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), que no se sometió previamente a un tratamiento térmico elevado (por ejemplo, 56 °C durante 30 minutos). Esto puede producir proteína que contiene Fc que no contiene cantidades, o muy bajas, de ácido siálico, debido a la presencia natural en el suero de enzimas sialidasas activas que pueden eliminar ácido siálico de las proteínas que contienen Fc secretadas de aquellas células. En otra realización, las células que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan tanto en presencia de suero que se sometió a un elevado tratamiento térmico, inactivando así las enzimas sialidasas, como en ausencia de suero u otros componentes del medio que pueden contener enzimas sialidasas, de forma que la proteína que contiene Fc tenga mayores niveles de ácido siálico, para aplicaciones (por ejemplo, indicaciones terapéuticas) cuando aquellas pudieran ser deseables.

En otra realización, las condiciones usadas para purificar y procesar adicionalmente proteínas que contienen Fc están establecidas, que favorecerán el óptimo contenido de ácido siálico. Por ejemplo, debido a que el ácido siálico es lábil a los ácidos, la prolongada exposición a un entorno de pH bajo, por ejemplo, tras la elución de una columna de cromatografía de proteína A o durante procesos de inactivación viral, puede conducir simultáneamente a una reducción en el contenido de ácido siálico.

Manipulación de células huésped

Como se describe en el presente documento, la célula huésped elegida para la expresión de la proteína que contiene Fc recombinante o anticuerpo monoclonal es un contribuyente importante a la composición final, que incluye, sin limitación, la variación en la composición de los restos de oligosacáridos que decoran la proteína en el dominio CH2 de inmunoglobulina. Así, un aspecto de la divulgación implica la selección de células huésped apropiadas para el uso y/o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

En una realización, la célula huésped es una célula que es naturalmente deficiente o que carece de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped está genéticamente modificada o se trata de manera que carezca de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped es una línea de célula huésped derivada seleccionada para expresar niveles reducidos o indetectables de sialiltransferasas. En otra realización más, la célula huésped carece naturalmente de, o está genéticamente modificada o se trata de manera que carezca de, CMP-ácido siálico sintetasa, la enzima que cataliza la formación de CMP-ácido siálico, que es la fuente de ácido siálico usada por la sialiltransferasa para transferir ácido siálico al anticuerpo. En una realización relacionada, la célula huésped puede carecer naturalmente de, o se modifica genéticamente o se trata de manera que carezca de, ácido pirúvico sintetasa, la enzima que forma el ácido siálico a partir del ácido pirúvico.

En una realización adicional, la célula huésped puede carecer naturalmente de, o está genéticamente modificada o se trata de manera que carezca de, galactosiltransferasas, de forma que los anticuerpos expresados sobre dichas células carecen de galactosa. Sin galactosa, el ácido siálico no se unirá. En una realización separada, la célula huésped célula puede expresarse naturalmente en exceso, o modificarse genéticamente para expresar en exceso, una enzima sialidasa que elimina ácido siálico de anticuerpos durante la producción. Una enzima sialidasa tal puede actuar intracelularmente sobre anticuerpos antes de que los anticuerpos sean secretados o se secreten en el medio de cultivo y actúen sobre anticuerpos que ya se han secretado en el medio. Se han descrito métodos de selección de líneas celulares con glicosilasas alteradas y que expresan glicoproteínas con composiciones de hidratos de carbono alteradas (Ripka y Stanley, 1986. Somatic Cell Mol Gen 12:51-62; documento US2004/0132140). Se han enseñado métodos de manipulación de células huésped para producir anticuerpos con patrones de glicosilación alterados que producen ADCC mejorada en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.602.864, en los que las células huésped alojan un ácido nucleico que codifica al menos una glicoproteína que modifica glicosilo transferasa, específicamente $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII).

Otros enfoques para manipular genéticamente las propiedades de glicosilación de una célula huésped mediante manipulación de la célula huésped glicosiltransferasa implican eliminar o suprimir la actividad, como se enseña en el documento EP 1.176.195, específicamente, alfa1,6 fucosiltransferasa (producto génico FUT8). Sería obvio para un experto en la materia poner en práctica los métodos de ingeniería de células huésped en distintos de los ejemplos específicos citados anteriormente. Además, la célula huésped manipulada puede ser de origen de mamífero o puede seleccionarse de mieloma, linfoma, levadura, insecto o células vegetales, o cualquier derivado, célula inmortalizada o transformada de las mismas.

En otra realización, el método de suprimir o eliminar la actividad de la enzima requerida para la unión del ácido siálico puede seleccionarse del grupo que consiste en silenciamiento de genes, tal como por el uso de ARNip, inactivación génica o adición de un inhibidor de enzima, tal como por co-expresión de un Ab intracelular o péptido específico para la enzima que se une y bloquea su actividad enzimática, y otras técnicas de ingeniería genética conocidas. En otra realización, un método de mejorar la expresión o actividad de una enzima que bloquea la unión del ácido siálico, o una enzima sialidasa que elimina ácidos siálicos que ya se han unido, puede seleccionarse del grupo que consiste en transfecciones con genes de enzimas recombinantes, transfecciones de factores de transcripción que mejoran la síntesis de ARN de enzimas, o modificaciones genéticas que mejoran la estabilidad de ARN de enzima, conduciendo todos a la mejorada actividad de enzimas, tales como sialidasas, que producen menores niveles de ácido siálico en el producto purificado. En otra realización, pueden añadirse inhibidores de enzima específicos al medio de cultivo celular.

Anticuerpos

Un anticuerpo descrito en la presente solicitud puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, tal como, pero no se limita a, un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos e incluye anticuerpos anti-integrina humanos, de primate, roedor, de mamífero, quiméricos, humanizados y/o injertados en CDR aislados, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras porciones especificadas y variantes de los mismos. La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o complementarios, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos, plantas transgénicas y métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe en el presente documento juntos como combinados con lo que se conoce en la técnica.

La presente divulgación proporciona además células, líneas celulares y cultivos celulares que expresan una inmunoglobulina o fragmento de la misma capaz de glicosilación en un dominio CH2 que se une a antígeno, una citocina, una integrina, un anticuerpo, un factor de crecimiento, un antígeno de superficie que es un marcador de linaje y diferenciación celular, una hormona, un receptor o proteína de fusión del mismo, una proteína de la sangre, una proteína que participa en la coagulación, cualquier fragmento de la misma, y cualquier análogo estructural o funcional de cualquiera de los anteriores. En una realización preferida, la inmunoglobulina, fragmento o derivado de la misma se une al antígeno sobre la superficie de una célula diana. En una realización particularmente preferida, la célula diana es una célula tumoral, una célula de la vasculatura tumoral o una célula inmunitaria. En una realización específica, la inmunoglobulina, fragmento o derivado de la misma se une a TNF, una integrina, un antígeno de linfocito B o factor de tejido.

En otra realización más, las células, líneas celulares y cultivos celulares de la presente divulgación pueden expresar detectablemente una proteína de fusión que comprende un factor de crecimiento u hormona. Ejemplos de los factores de crecimiento contemplados por la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, un factor de crecimiento humano, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento epidérmico, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento nervioso, una gonadotropina coriónica humana, una eritropoyetina, una trombopoyetina, una proteína morfogénica ósea, un factor de crecimiento transformante, un factor de crecimiento similar a la insulina, o un péptido tipo glucagón, y cualquier análogo estructural o funcional de los mismos.

Anticuerpos aislados de la invención incluyen aquellos que tienen isotipos de anticuerpo con actividad de ADCC,

especialmente IgG1 humana (por ejemplo, IgG1kappa e IgG1lamda), y, son menos preferidos IgG2 e IgG3, o isotipos híbridos que contienen residuos alterados en residuos específicos en los dominios Fc son sus homólogos de otras especies. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, IgG1) o pueden incluir solo una porción de unión al antígeno y una porción Fc o dominio que puede provocar funciones efectoras que incluyen ADCC, activación del complemento y unión a C1q.

Además, el fragmento de inmunoglobulina producido por las células, líneas celulares y cultivos celulares de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, Fc u otro dominio CH2 que contiene estructuras y cualquier análogo estructural o funcional del mismo. En una realización, el fragmento de inmunoglobulina es un polipéptido de fusión de dominio de receptor dimérico. En una realización específica, el polipéptido de fusión de dominio de receptor dimérico es etanercept. Etanercept es una molécula de receptor de TNF α soluble recombinante que se administra subcutáneamente y se une a TNF α en el suero del paciente, haciéndolo biológicamente inactivo. Etanercept es una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton (p75) humano ligado a la porción Fc de IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el CH3 dominio y la región bisagra, pero no el dominio CH1 de IgG1.

Otros productos aceptados para la fabricación usando las líneas celulares de la divulgación incluyen proteínas terapéuticas o profilácticas actualmente fabricadas por otros tipos de líneas de células de animal y que tienen un CH2 que puede estar glicosilado. Particularmente se prefieren aquellas proteínas que contienen el dominio CH2 glicosiladas terapéuticas que se unen a antígenos diana sobre una superficie celular, tipo de célula que se desea incapacitar o eliminar del cuerpo. Varios de tales anticuerpos terapéuticos se manipulan para contener la IgG1 humana, especialmente la IgG1 cuya cadena pesada comprende un dominio CH1, CH2 y CH3 humano. Tales proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas en el presente documento más adelante.

Infliximab se comercializa ahora como REMICADE®. Infliximab es un anticuerpo monoclonal IgG1k quimérico con un peso molecular aproximado de 149.100 daltons. Comprende regiones constantes humanas y variables murinas. Infliximab se une específicamente al factor de necrosis tumoral alfa (TNF(alfa)) humano con una constante de asociación de 10^{10} M^{-1} . Infliximab neutraliza la actividad biológica de TNF(alfa) uniéndose con alta afinidad a las formas solubles y transmembranarias de TNF(alfa) e inhibe la unión de TNF(alfa) con sus receptores. Células que expresan TNF(alfa) transmembranario unido por infliximab pueden lisarse *in vitro* o *in vivo*. Infliximab se indica para el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y espondilitis alquilosante. Infliximab se administra como dosis de 3 a 5 mg/kg administradas como una infusión intravenosa, seguido de dosis similares adicionales a 2, 6 y/o 8 semanas a partir de aquí y a intervalos de cada 8 semanas dependiendo de la enfermedad que va a tratarse.

Daclizumab (comercializado como ZENAPAX®) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado inmunosupresor producido por tecnología de ADN recombinante que se une específicamente a la subunidad alfa (p55 alfa, CD25, o subunidad Tac) del receptor de interleucina-2 (IL-2) de alta afinidad humana que se expresa sobre la superficie de linfocitos activados. Daclizumab es un anticuerpo quimérico ratón-humo injertado en regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las secuencias humanas se derivaron de los dominios constantes de IgG1 humana y las regiones estructurales variables del anticuerpo de mieloma Eu. Las secuencias murinas se derivaron de las CDR de un anticuerpo murino anti-Tac. Daclizumab se indica para la profilaxis de rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes renales y se usa generalmente como parte de una pauta inmunosupresora que incluye ciclosporina y corticosteroides.

Basiliximab (comercializado como SIMULECT®) es un anticuerpo monoclonal quimérico (murino/humano) producido por tecnología de ADN recombinante, que sirve de agente inmunosupresor, uniéndose específicamente a y bloqueando la cadena (alfa) del receptor de interleucina-2 (IL-2R(alfa), también conocido como antígeno CD25) sobre la superficie de linfocitos T activados. Basándose en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular calculado de la proteína es 144 kilodaltons. Es una glicoproteína obtenida de la fermentación de una línea de células de mieloma de ratón establecida genéticamente manipulada para expresar plásmidos que contienen los genes humanos de la región constante de la cadena pesada y ligera (IgG1) y genes de ratón de la región variable de la cadena pesada y ligera que codifican el anticuerpo RFT5 que se une selectivamente a IL-2R(alfa). Basiliximab se indica para la profilaxis de rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes renales cuando se usa como parte de una pauta inmunosupresora que incluye ciclosporina y corticosteroides.

Adalimumab (comercializado como HUMIRA®) es un anticuerpo monoclonal humano IgG1 recombinante específico para factor de necrosis tumoral (TNF) humano. Adalimumab fue creado usando tecnología de expresión en fago produciendo un anticuerpo con regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras derivadas humanas y regiones constantes de IgG1 kappa humanas. HUMIRA® se indica para reducir signos y síntomas e inhibir la progresión de daño estructural en pacientes adultos con artritis reumatoide de moderadamente a gravemente activa que han tenido una respuesta inadecuada a uno o más DMARD. HUMIRA® puede usarse solo o en combinación con MTX u otros DMARD.

Rituximab (comercializado como RTTUXAN®) es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano genéticamente manipulado dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1 kappa que contiene secuencias de la región variable de las

5 cadenas ligeras y pesadas murinas y secuencias de la región constante humana. Rituximab tiene una afinidad de unión por el antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM. Rituximab se indica para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B recidivante o resistente al tratamiento, de bajo grado o folicular, positivo para CD20. RITUXAN® se administra como infusión IV a 375 mg/m² una vez a la semana durante 4 u 8 dosis.

10 Trastuzumab (comercializado como HERCEPTIN®) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd=5nM) al dominio extracelular de la proteína el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2. El anticuerpo es una IgG 1 kappa que contiene regiones estructurales humanas con las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. HERCEPTIN se indica como terapia de un único agente para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER2 y que han recibido uno o más ciclos de quimioterapia para su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® en combinación con paclitaxel se indica para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica. La dosificación recomendada es una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de trastuzumab administrado como una infusión de 90 minutos y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de trastuzumab que puede administrarse como una infusión de 30 minutos si la dosis de carga inicial fue bien tolerada.

20 Alemtuzumab (comercializado como CAMPATH®) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante (Campath-1H) que está dirigido contra la glicoproteína de la superficie celular de 21-28 kD, CD52. Alemtuzumab se une a CD52, un antígeno no modulador que está presente sobre la superficie de esencialmente todos los linfocitos B y T, la mayoría de los monocitos, macrófagos y linfocitos NK, una subpoblación de granulocitos y tejidos del aparato reproductor masculino. El anticuerpo Campath-1H es una IgG1 kappa con regiones estructurales variables y constantes humanas, y regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo monoclonal murino (rata) (Campath-1G). Campath se indica para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-LLC) en pacientes que se han tratado con agentes alquilantes y que han fracasado en la terapia con fludarabina. La determinación de la eficacia de Campath se basa en tasas de respuesta global. Campath se administra inicialmente a 3 mg administrado como una de infusión IV de 2 horas diarias; una vez tolerada la dosis diaria debe aumentarse a 10 mg y continuar hasta que se tolere. Una vez se ha tolerado este nivel de dosis, puede iniciarse la dosis de mantenimiento de Campath de 30 mg y administrarse tres veces por semana durante hasta 12 semanas. En la mayoría de los pacientes, el aumento de dosis a 30 mg puede llevarse a cabo en 3-7 días.

35 Omalizumab (comercializado como XOLAIR®) es un anticuerpo monoclonal IgG1(kappa) humanizado recombinante que se une selectivamente a inmunoglobulina humana E (IgE). Omalizumab inhibe la unión de IgE al receptor de IgE de alta afinidad (Fc(épsilon)RI) sobre la superficie de mastocitos y basófilos. La reducción en IgE unida a la superficie sobre células que llevan Fc(epsilon)RI limita el grado de liberación de mediadores de la respuesta alérgica. El tratamiento con omalizumab también reduce el número de receptores Fc(epsilon)RI sobre basófilos en pacientes atópicos. Omalizumab se indica para adultos y adolescentes (12 años de edad y más) con asma persistente de moderada a grave que dan positivo en una prueba de la piel o reactividad *in vitro* a un aeroalergeno perenne y cuyos síntomas están inadecuadamente controlados con corticosteroides inhalados. Omalizumab se administra SC cada 2 ó 4 semanas a una dosis de 150 a 375 mg.

45 Efalizumab (RAPTIVA®) es un anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 kappa humanizado recombinante inmunosupresor que se une a CD11a humana. Efalizumab se une a CD11a, la subunidad (alfa) del antígeno 1 de función leucocitaria (LFA-1), que se expresa en todos los leucocitos, y disminuye la expresión superficial de células de CD11a. Efalizumab inhibe la unión de LFA-1 a la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), inhibiendo así la adhesión de leucocitos a otros tipos de células. La interacción entre LFA-1 y ICAM-1 contribuye al inicio y mantenimiento de múltiples procesos, que incluyen la activación de linfocitos T, adhesión de linfocitos T a células endoteliales y migración de linfocitos T a sitios de inflamación que incluyen piel psoriásica. La activación y el tráfico de linfocitos a la piel desempeñan una función en la patofisiología de la psoriasis crónica en placas. En piel psoriásica, la expresión de la superficie celular ICAM-1 está regulada por incremento en endotelio y queratinocitos. CD11a también se expresa sobre la superficie de linfocitos B, monocitos, neutrófilos, linfocitos citolíticos espontáneos y otros leucocitos. Por tanto, existe la posibilidad de que efalizumab afecte la activación, adhesión, migración y números de células distintos de linfocitos T. La dosis recomendada de RAPTIVA® es una dosis única acondicionada de 0,7 mg/kg SC seguido de dosis SC semanales de 1 mg/kg (la máxima dosis única no debe superar un total de 200 mg).

60 En otra realización, una línea celular de la divulgación se transfecta establemente o se manipula de otro modo para expresar un polipéptido derivado no de inmunoglobulina, pero que entra dentro de la definición de una proteína que contiene Fc.

65 Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y proteínas de la presente invención pueden derivarse de varias formas muy conocidas en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos se obtienen convenientemente de hibridomas preparados inmunizando un ratón con los péptidos de la invención. Los anticuerpos pueden así obtenerse usando cualquiera de las técnicas de hibridomas muy conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

5 En otro método conveniente de derivar la porción de unión a diana del anticuerpo, normalmente los dominios pesados variables y/o ligeros variables de un anticuerpo, estas porciones están seleccionadas de una biblioteca de tales dominios de unión creada en, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Una biblioteca de fagos puede crearse insertando una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, tales como de los linfocitos B de un animal inmunizado o ser humano (Smith, G.P. 1985. Science 228: 1315-1317). Bibliotecas en fago de anticuerpos contienen pares de la región variable de la cadena pesada (H) y ligera (L) en un fago que permite la expresión de fragmentos Fv monocatenarios o fragmentos Fab (Hoogenboom, et al., 2000, Immunol. Today 21(8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede manipularse para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos monoclonales humanos deseables adicionales. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina de cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) que codifica genes puede mezclarse aleatoriamente (barajarse) para crear nuevos pares de HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Adicionalmente, cualquiera o ambas de la cadena H y L que codifica genes puede mutagenizarse en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente cribarse para capacidades de afinidad y de neutralización deseables. También pueden crearse bibliotecas de anticuerpos sintéticamente seleccionando una o más secuencias de la región estructural humana e introduciendo conjuntos de casetes de CDR derivados de repertorios de anticuerpos humanos o mediante variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13:598-602). Las posiciones de diversidad no se limitan a CDR, pero también pueden incluir los segmentos de la región estructural de las regiones variables o pueden incluir distintas regiones variables de anticuerpos, tales como péptidos.

25 Otras bibliotecas de componentes de unión a diana que pueden incluir regiones variables de anticuerpos son expresión en ribosoma, expresión en levadura y expresiones bacterianas. La expresión en ribosoma es un método de traducción de ARNm en sus proteínas relacionadas mientras que se mantiene la proteína unida al ARN. La secuencia codificante de ácidos nucleicos se recupera por RT-PCR (Mattheakis, L.C. et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022). La expresión en levadura se basa en la construcción de proteínas de fusión del receptor de adhesión de levadura de alfa-aglutinina asociado a la membrana, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo apareamiento (Broder, et al., 1997. Nature Biotechnology, 15:553-7). La expresión bacteriana se basa en la fusión de la diana con proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o pared celular (Chen y Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79:496-503).

35 En comparación con la tecnología de hibridomas, los métodos de expresión en fago y otros anticuerpos proporcionan la oportunidad de manipular la selección contra el antígeno diana *in vitro* y sin la limitación de la posibilidad de efectos del huésped sobre el antígeno o viceversa.

40 *Células huésped*

Las células huésped descritas en el presente documento comprenden células huésped que pueden producir anticuerpos específicos con contenido de ácido siálico definido en el contenido de oligosacárido de dichos anticuerpos.

45 A diferencia de la mayoría de los genes que se transcriben de secuencias de ADN genómico continuo, los genes de anticuerpo se ensamblan de segmentos de genes que pueden separarse ampliamente en la línea germinal. En particular, se forman genes de la cadena pesada por recombinación de tres segmentos genómicos que codifican las regiones variables (V), de diversidad (D) y de unión (J)/constantes (C) del anticuerpo. Se forman genes de la cadena ligera funcional uniendo dos segmentos de genes; uno codifica la región V y el otro codifica la región J/C. Tanto los loci de la cadena pesada como la cadena ligera kappa contienen muchos segmentos del gen V (los cálculos estimados varían entre 100 s y 1000 s) que se estima que se extienden más de 1000 kb. El locus lambda es, sin embargo, mucho más pequeño y se ha mostrado que se extiende aproximadamente 300 kb sobre el cromosoma 16 en el ratón. Consiste en dos segmentos de genes variables y cuatro segmentos de genes de la región de unión/constante (J/C). La formación de un gen funcional requiere la recombinación entre un elemento V y uno J/C.

55 En el linfocito B en el que el anticuerpo se produce naturalmente, el control de la transcripción de ambos genes de la cadena pesada y ligera reorganizados depende tanto de la actividad de un promotor específico de tejido en la dirección 5' de la región V como un potenciador específico de tejido localizado entre el intrón J-C. Estos elementos actúan sinérgicamente. Por tanto, se ha identificado un segundo potenciador específico de linfocitos B en el locus de la cadena ligera kappa. Este potenciador adicional se localiza 9 kb en la dirección 3' de C_{kappa}. Así, el método de hibridoma de inmortalizar genes de expresión de anticuerpos se basa en el promotor endógeno y secuencias potenciadoras del linaje de linfocitos B parentales. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden expresarse en una célula huésped mediante activación (por manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y

5.733.761.

- La clonación de ADN genómico de anticuerpo en un vector artificial es otro método de crear células huésped que pueden expresar anticuerpos. Sin embargo, la expresión de anticuerpos monoclonales detrás de un promotor fuerte aumenta las posibilidades de identificar líneas celulares de alta producción y de obtener mayores rendimientos de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de la invención pueden producirse en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es muy conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).
- Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son muy conocidos. Células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levadura y sistemas de baculovirus y plantas transgénicas y animales. Líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen proteínas glicosilados intactas. Las células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de melanoma de ratón NSO y líneas celulares derivadas, por ejemplo, células de mieloma de rata SP2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), células de riñón embrionario humano (HEK), células de retina embrionaria humana, células PerC.6, células hep G2, BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26) y muchas otras disponibles de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va (www.atcc.org). Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*.
- Células de mamífero tales como células CHO, células de mieloma, células HEK293, células BHK (BHK21, ATCC CRL-10), células Ltk de ratón y células NIH3T3 se han usado frecuentemente para la expresión estable de genes heterólogos. Líneas celulares tales como Cos (COS-1 ATCC CRL 1650; COS-7, ATCC CRL-1651) y HEK293 se usan rutinariamente para la expresión transitoria de proteínas recombinantes.
- Células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de mieloma tales como Sp2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), NSO y P3X63.Ag8.653 (por ejemplo, SP2/0-Ag14) debido a su alta tasa de expresión. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células huésped se cultivan. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.
- Las células CHO-K1 y DHFR-CHO, DG44 y DUK-B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4216-4220) se usan para la producción de proteínas de alto nivel debido a que la amplificación de genes de interés se posibilita por la incorporación de un marcador amplificable de selección, DHFR, usando, por ejemplo, el fármaco metotrexato (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185: 537-566). Las células DHFR-CHO pueden usarse satisfactoriamente para producir mAb recombinantes a un alto nivel. DHFR-CHO puede producir anticuerpos anti-MCP-1 a la tasa de 80-110 mg 10^6 células⁻¹ día⁻¹ o superior a 200 mg 10^6 células⁻¹ día⁻¹. Se han usado una variedad de promotores para obtener la expresión de cadenas H y L en estas células CHO, por ejemplo, el promotor de b-actina, el promotor MIE del CMV humano, el promotor tardío principal de virus Ad (MLP), el promotor de RSV y una LTR del virus de la leucemia murina. Varios vectores para la expresión de mAb se describen en la bibliografía en la que las dos cadenas de Ig son llevadas por dos plásmidos diferentes con un marcador de selección/amplificable independiente. Vectores que contienen una cadena de anticuerpo, por ejemplo, la cadena H, asociada a un marcador DHFR, y un casete de expresión de la cadena L con el marcador Neo^r o viceversa pueden usarse para obtener hasta 180 mg de un mAb humanizado L⁻¹ 7 día⁻¹ en matraces con agitación. Los métodos usados para la selección inicial y posterior amplificación pueden variarse y son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. En general, la expresión de mAb de alto nivel puede obtenerse usando las siguientes etapas: selección inicial y posterior amplificación de clones candidatos, coselección (por ejemplo, en casos en los que tanto los vectores de expresión de cadenas H como de cadenas L llevan la unidad de expresión DHFR) y amplificación, coamplificación usando diferentes marcadores amplificables, y selección y amplificación inicial en cultivo de masa, seguido de clonación por dilución para identificar clones de alta expresión individual. Debido a que los sitios de integración pueden influir en la eficiencia de la expresión de cadenas H y de cadenas L y la expresión de mAb global, se han creado vectores individuales en los que las dos unidades de expresión de las cadenas de Ig se colocan en tándem. Estos vectores también llevan un marcador de selección dominante tal como Neo^r y el casete de expresión DHFR. Para una revisión véase Ganguly, S. y A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 por John Wiley & Sons, Inc.
- Cockett et al., (1990. Bio/Technology 8, 662-667) desarrollaron el sistema GS para la expresión de alto nivel de genes heterólogos en células CHO. La transfección de un vector de expresión que contiene un ADNc (bajo el control transcripcional del promotor del hCMV) y un minigen GS (bajo el control del promotor tardío del SV40) en células CHO-K1 (seguido de selección con MSX 20 mM a 500 mM) puede usarse para dar clones que expresan los anticuerpos de la divulgación en rendimientos comparables a aquellos de los sistemas de DHFR-CHO. El sistema GS se trata por completo o en parte a propósito de las patentes europeas n° 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la solicitud de patente europea n° 89303964.4.

Aunque se ha descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se desvelarán adicionalmente en los siguientes ejemplos.

5 EJEMPLO 1: SEPARACIÓN BASADA EN LECTINA DE ESPECIES DE ANTICUERPOS CON DIFERENTES NIVELES DE ÁCIDO SIÁLICO

Se compraron perlas de agarosa conjugadas con MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) de tanto Vector Labs como EY Labs. El anticuerpo de prueba, Ab1, es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a TNF humano. Se fraccionó Ab1 (~1-10 mg) en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) que contenía CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM sobre una columna de MAA-agarosa o WGA-agarosa. El Ab1, que se unió a la columna de MAA, se eluyó con 0,5 % de ácido acético, se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 7,0) y luego se cambió el tampón en PBS. Este material se llamó MAAB de Ab1.

Después de cargar la muestra de anticuerpo Ab1 sobre la columna de WGA-agarosa, la fracción que no se unió (T, a través) se recogió y se intercambiò el tampón en PBS. Este material se llamó WGAT de Ab1. La columna que contiene Ab1 unido se lavó con el mismo tampón que se ha descrito anteriormente y cualquier anticuerpo eluyente, que representa material débilmente unido (R, retardado), se recogió en fracciones de 1 ml mientras que se monitorizó midiendo la DO a 280 nm. El material eluido se intercambiò con tampón en PBS y se llamó WGA-R de Ab1. Finalmente, el material todavía unido a la columna después del lavado se eluyó con disolución 200 mM de GlcNAc y la muestra se intercambia con tampón en PBS. Este material se llamó WGAB de Ab1. Los análisis de HPLC y de espectrometría de masas mostraron que los sublotos de Ab1 varían de hecho en su contenido de ácidos siálicos (véase Tabla 1), que oscilan de un nivel alto del 43 % para MAAB de Ab1 a un nivel bajo del 29 % para WGAT de Ab1. Otro lote de Ab1-29 sin modificar se pasó directamente sobre la lectina aglutinina de germen de trigo inmovilizada (WGA). Se determinaron la fracción de flujo a través y una fracción débilmente unida que contenía 29 % y 41 % de glicanos sialilados, respectivamente, y se llamaron Ab1-WGA-29 y Ab1-WGA-41.

Otro Ab anti-TNF, Ab2, que contenía aproximadamente 5 % de sialilación de Fc, se trató primero con galactosiltransferasa para preparar material completamente galactosilado antes del fraccionamiento de la columna de WGA, produciendo una gran cantidad de Ab2-GT-WGA-5 y una cantidad pequeña de Ab2-GT-WGA-67. El antígeno reconocido por Ab2 es que mismo que aquél para Ab1, y un anticuerpo anti-idiotipo (anti-Id) reconocido Ab2 se llama anti-Id2.

35 EJEMPLO 2: MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA GALACTOSILACIÓN Y SIALILACIÓN DE ANTICUERPOS

Para galactosilar muestras de anticuerpo purificado mediante método enzimático, se añaden β-1,4-galactosiltransferasa (β1,4GT) bovina y UDP-Gal obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a muestras de anticuerpo. Se obtuvieron α-2,3-sialiltransferasa de hígado de rata recombinante (α2,3ST), α-1,3-galactosiltransferasa recombinante (α1,3GT) y CMP-Sia de Calbiochem (San Diego, CA). Se obtuvo PNGasa F de New England Biolabs (Beverly, MA) o de Prozyme (San Leandro, CA) o de Selectin BioSciences (Pleasant Hill, CA). Se obtuvieron β-galactosidasa y β-glucosaminidasa de *Diplococcus pneumoniae* de tanto ProZyme como de Selectin BioSciences. La β-galactosidasa de riñón bovino y todas las otras enzimas fueron tanto de ProZyme como de Selectin BioSciences. Las columnas de proteína A NAP-5 y HiTrap fueron de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Todos los otros reactivos fueron de calidad analítica.

Se preparó una forma enzimáticamente desglicosilada (llamada Gno) de Ab1 para servir de anticuerpo de control que carece de función efectora inmunitaria de Fc. Esta variante se preparó tomando Ab1 (~10 mg en 1,0 ml de tampón) en tampón MES 100 mM (pH 7,0) y tratándolo con 1000 U de PNGasa F a 37 °C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de enzima y la incubación continuó durante 24 horas adicionales. El Ab1 desglicosilado se purificó usando una columna de proteína A HiTrap y se formuló en PBS, pH 7,0. La glicofoma de Gno se caracterizó por EM MALDI-TOF para confirmar la desglicosilación.

Además de las preparaciones de Ab manipuladas de laboratorio, también se compararon sublotos de Ab que se diferencian naturalmente en el contenido de ácido siálico, denominados aquí variantes 'naturales'. El anticuerpo sin modificar se llamó PBS de Ab1 después de que el material del lote original se intercambiara con tampón en PBS. Los Ab monoclonales IgG1 humanos, Ab1 y Ab3, en los que miembros de un par se diferenciaron en el grado de sialilación de Fc, aparentemente debido a los diferentes procesos de producción usados para prepararlos (pero producidos por el mismo tipo de células huésped). Las variantes de Ab1, Ab1-20 y Ab1-29, contuvieron 20 % y 29 % de glicanos sialilados, respectivamente, y las variantes de Ab5, Ab5-20 y Ab5-26, contuvieron 0 % y 26 % de glicanos sialilados, respectivamente. De otro modo, miembros de cada par tuvieron las mismas secuencias de aminoácidos, los mismos niveles de fucosilación de Fc y contenido de GlcNAc bisecante (análisis de espectrometría de masas de MALDI-TOF), y el mismo bajo nivel de agregados de Ab (<1 % por análisis de SEC-HPLC).

Un resumen de Ab y preparaciones de proteína que contienen Fc usados en los diversos bioensayos y el modo en que se derivaron se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista resumen de preparaciones de proteínas que contienen Fc usadas en el presente documento

5 **Tabla 1. Lista resumen de preparaciones de proteínas que contienen Fc usadas en el presente documento**

Anticuerpo parental	Variante Específica	% de sialilación	Descripción
Ab1	-	-	Anticuerpo IgG1 humana anti-TNF
10	Ab1 no modificado, Abl-29	29	En formulación original, variante de ácido siálico natural
	Ab1 Gno	N.A.	enzimáticamente desglucosilada
	Ab1PBS	29	Sin modificar, tampón intercambiado en PBS
15	Ab1-20	20	variante de ácido siálico natural
	Ab1MAAB	43	Unido a columna de lectina MAA
	Ab1WGAB	32	Unido a columna de lectina MAA
20	Ab1WGAR	40	Retrasado por columna de lectina WGA
	Ab1WGAT	29	Pasado a través de columna de lectina WGA
	Ab1-WGAR-41	41	Retrasado por columna de lectina WGA
25	Abl-WGAT-29	29	Pasado a través de columna de lectina WGA
	Ab1 G2	0	Enzimáticamente modificado a galactosilación completa
	Ab1 G2S2(hi)	95	Modificado enzimáticamente a G2S2
30	Ab1 G2S2(lo)	33	G2S2 que perdió la mayoría del ácido siálico
	Ab 2	-	Anticuerpo IgG1 humana anti-TNF
	Ab2 no modificado	5%	Sin modificar usado en unión con FcγRI, Fig. 6
35	Ab2 G2	0%	modificado; usado en estudio PK de ratón, Fig. 8
	Ab2 G2S2	~90%	modificado; usado en estudio PK de ratón, Fig. 8
	Ab2 AlaAla	not relevant	Anti-TNF mutante que carece de afinidad para FcγR
40	Ab2 GT-WGAT	5	Pasado a través de columna de lectina WGA
	Ab2 GT-WGAR	67	Galactosilado y unido a una columna de lectina WGA
45	Ab3	-	Específico para una subunidad de citocina
	Ab3(lo)	2	Variante de ácido siálico natural
	Ab3(hi)	42	Variante de ácido siálico natural
50	Ab4	-	IgG1 de ratón (carece de afinidad para FcγRI humana)
	Ab5		Se une al receptor de superficie celular heterodimérico
	Ab5-0	0	Variante de glicosilación natural
55	Ab5-26	26	Variante de glicosilación natural
	FcP1	-	Contiene Fc, proteína no Ab
	FcPI no modificado	5	Sin modificar, para PK, Fig. 8
60	FcPI G2S2	~98	Modificado a G2S2, para PK, Fig. 8

65 Las muestras de prueba contienen todas bisagra de IgG1 humana, dominios CH2 y CH3. Ab1, Ab2, Ab3 y Ab5 son Ab IgG monoclonales con IgG1 humana y regiones constantes kappa. Ab1 es un Ab completamente humano específico para TNF humano y Ab2 es un Ab quimérico de ratón/humano específico para TNF humano. Ab3 es un Ab completamente humano específico para una de las subunidades de una citocina proinflamatoria heterodimérica.

Los cuatro Ab se expresaron en células de mieloma de ratón Sp2/0 transfectadas. El Ab5 es un anticuerpo completamente humano dirigido a una subunidad de un receptor de la superficie celular heterodimérico. FcP1 es una proteína de fusión dimérica que comprende la bisagra de IgG1 humana, los dominios CH2 y CH3.

5 Se prepararon glicoformas G2 sometiendo muestras de IgG en tampón MES 100 mM (pH 7,0) (~10 mg en 1,0 ml de tampón) a 50 miliunidades de β 1,4GT, 5 μ moles de UDP-Gal y 5 μ moles de $MnCl_2$ a 37 °C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de enzima y UDP-Gal y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37 °C. Las muestras de IgG regalactosiladas se purificaron usando una columna de proteína A HiTrap. Los oligosacáridos se liberaron por PNGasa F y se caracterizaron por EM MALDI-TOF y por HPLC como se describe a continuación.

10 La glicoforma G2S2 se preparó poniendo muestras de IgG en tampón MES 100 mM (pH 7,0) (~10 mg en 1,0 ml de tampón) usando columnas NAP-5 según el protocolo sugerido por el fabricante. A esta disolución se añadieron 50 miliunidades de cada uno de β 1,4GT y α 2,3ST y 5 μ moles cada uno de UDP-Gal, CMP-Sia (isómero NANA) y $MnCl_2$. La mezcla se incubó a 37 °C. Después de 24 horas, se añadió otra alícuota de enzimas junto con los azúcares de nucleótido y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37 °C. La glicoforma G2S2 de muestras de IgG se purificó como se ha descrito anteriormente. Para un lote G2S2 de Ab1 particular, G2S2(lo) de Ab1, el ácido siálico que se unió originalmente se perdió posteriormente durante el almacenamiento, posiblemente debido a una sialidasa contaminante. Los análisis mostraron que solo el 30 % de los oligosacáridos de Fc en G2S2(lo) de Ab1 contuvieron ácido siálico, mientras que ~95 % de oligosacáridos en G2S2(hi) de Ab1 contuvieron ácido siálico.

25 Las estructuras de glicano de las preparaciones de Ab se analizaron por diversos métodos. Para realizar análisis de EM MALDI-TOF de Ab IgG intactos, se pusieron muestras de IgG en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, y la concentración se ajustó a ~1 mg/ml de tampón. Se mezclaron aproximadamente 2 μ l de disolución de IgG con 2 μ l de disolución de matriz (la disolución de matriz se preparó disolviendo 10 mg de ácido sinapínico en 1,0 ml de acetonitrilo al 50 % en agua que contenía 0,1 % de ácido trifluoroacético) y se cargaron 2 ml de esta disolución sobre la diana y se dejó que se secaran al aire. Se adquirió EM MALDI-TOF usando un instrumento Voyager DE de Applied Biosystems (Foster City, CA).

30 Para realizar análisis de EM MALDI-TOF de glicanos de Fc liberados, muestras de IgG (~50 μ g), antes y después de las reacciones de glicosilación *in vitro*, se digirieron con PNGasa F en tampón Tris-HCl 10 mM (50 μ l) a pH 7,0 durante 4 horas a 37 °C. La digestión se detuvo acidificando la mezcla de reacción con 50 % de ácido acético (~ 5 μ l) y luego se pasó a través de una columna de resina de intercambio catiónico como se ha descrito previamente (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000). Estas muestras que contienen una mezcla de ácido y oligosacáridos neutros se analizaron por EM MALDI-TOF en los modos de ión positivo y negativo, como se describe en cualquier parte (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000) usando un instrumento Voyager DE de Applied Biosystems (Foster City, CA).

40 El análisis de HPLC de glicanos de Fc se hizo digiriendo muestras de IgG (~50 μ g) en tampón Tris-HCl 10 mM (~50 μ l) a pH 7,0 con PNGasa F a 37 °C durante 4-8 horas. La derivatización de los oligosacáridos liberados con ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico) se llevó a cabo como se ha descrito (véase Anumula KR, Anal Biochem. 2000 Jul 15;283(1):17-26). Brevemente, se preparó primero una disolución de 4 % de acetato sódico-3H₂O (peso/volumen) y 2 % de ácido bórico (peso/volumen) en metanol. A continuación, el reactivo de derivatización se preparó fresco disolviendo ~30 mg de ácido antranílico (Aldrich) y ~20 mg de cianoborohidruro de sodio (Aldrich) en 1,0 ml de disolución de metanol-acetato sódico-borato. Los oligosacáridos derivados de IgG (<3 nmol en 20-50 μ l de agua) se mezclaron con 0,1 ml de la disolución de reactivo de ácido antranílico (AA) en 1,6 ml de viales de congelación de tapa roscada de polipropileno con anillos en "O" (Sigma) y se taparon fuertemente. Los viales se calentaron a 80 °C en una estufa o bloque térmico (Reacti-Therm, Pierce) durante 1-2 horas. Después de enfriarse los viales hasta temperatura ambiente, las muestras se diluyeron con agua para enrasarlas a ~0,5 ml. Los oligosacáridos derivatizados se purificaron usando columnas NAP-5.

EJEMPLO 3: UNIÓN A RECEPTORES DE FC CELULARES DE BAJA AFINIDAD

55 De los diversos tipos de receptores de Fc sobre células efectoras, los tipos II y III de Fc_{gamma} se consideran receptores de afinidad baja o intermedia. Generalmente, la unión monomérica puede ser de afinidad demasiado baja para ser detectada o a niveles muy bajos. Por ejemplo, la IgG monomérica que se une al tipo IIA de Fc_{gamma} es más difícil de medir. Estos receptores funcionan uniéndose a complejos inmunitarios, que debido a su naturaleza multivalente se unen más ávidamente, supuestamente debido a una baja constante de disociación del complejo.

60 Células K562 humanas, que expresan Fc γ RIIA como el único receptor de Fc γ , se usaron en dos tipos de ensayos de unión para probar si variaciones en el contenido de ácido siálico en el glicano de Fc afectan la unión a este receptor de Fc γ humano de baja afinidad. Para obtener avidez suficiente de la unión a Fc γ RIIA, que tiene baja afinidad por IgG monomérica, los complejos inmunitarios se prepararon mezclando Ab de prueba anti-TNF con TNF homotrímico en una relación molar 2:1, una relación que se mostró que solo producía cantidades traza de Ab libre o TNF libre. La dependencia de los complejos inmunitarios se ilustró cuando Ab2 radiomarcado solo que se une a las células K562

no fue detectable a concentraciones de hasta 1 ug/ml, pero los complejos de Ab2:TNF mostraron unión significativa a 0,02 ug/ml (datos no mostrados).

Formato de unión por competición. Se prepararon dos conjuntos de complejos inmunitarios de IgG, un complejo marcado que contenía el anticuerpo IgG1 humana con especificidad irrelevante complejado con un Ab no humano específico anti-región V y Ab5. Para crear el complejo marcado, un Ab monoclonal quimérico con regiones V de hámster con IgG1 humana y regiones constantes kappa de la cadena ligera se yodó usando el reactivo IODO-GEN como se ha descrito previamente (Knight et al., 1993). Entonces se mezcló un Ab monoclonal IgG2a de rata específico para el idiotipo de la región V de la quimera hámster-humano en una relación molar 1:1 en PBS durante 30 min para permitir la formación de complejos inmunitarios radiomarcados. Se mostró que anti-Id de rata no contribuía a la unión de Fc γ R1IA directamente como cuando los complejos se prepararon con la quimera de hámster-humano desglucosilada, se produjo poca unión; mientras que, complejos con Ab quimérico sin modificar, mostraron altos niveles de unión (datos no mostrados). Además, no hubo reactividad cruzada detectable entre los agentes usados para preparar los complejos inmunitarios separados que pudiera indicar que un complejo inmunitario podría unirse al otro complejo inmunitario (datos no mostrados).

Para los complejos de prueba, se mezclaron variantes de ácido siálico de Ab1 con homotrímero de TNF humano a una relación molar 2:1 (que se mostró por el análisis de dispersión de la luz que producía muy poco Ab sin unir más TNF sin unir) en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. En un conjunto de experimentos, se compararon complejos de variantes naturales de Ab1 con 20 y 29 por ciento de ácido siálico entre sí. En un segundo conjunto de experimentos, el complejo de Ab1 - 29:TNF se comparó con la preparación mejorada en columna de lectina complejo de Ab1 -43: TNF. En ambos casos, el complejo de control fue Ab1-Gno:TNF, en el que el anticuerpo se ha separado enzimáticamente del glicano.

Se sembraron células K562 humanas a 3×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos en IMDM, 5 % de FBS. Se añadió una cantidad fija del complejo de anticuerpo radiomarcado a cantidades variables del complejo de anticuerpo de prueba y la mezcla combinada se añadió a las células K562 de forma que cada pocillo contuviera una concentración final de 0,1 μ g/ml de complejo de anticuerpo yodado. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 4 °C, después de lo cual el Ab sin unir se eliminó lavando 3 veces con IMDM, 5 % de FBS, y el número de recuentos unidos a las células se determinó usando un contador gamma.

Resultados. Cantidades crecientes de complejos inmunitarios de competidor sin marcar se inhibieron cada vez más por el complejo inmunitario radiomarcado. Las variantes de ácido siálico, Ab1 sin modificar (29 % sialilado) y MAAB de Ab1 (43 % sialilado) mostraron que el complejo con el Ab más altamente sialilado se requirió a concentraciones 5 a 10 veces mayores que el complejo con el Ab1 menos sialilado con el fin de producir el mismo grado de unión a Fc γ R1II (Fig. 4A). Para las variantes de Ab1 naturales que se diferencian el 9 % de contenido de ácido siálico (20 frente a 29), la diferencia fue avidez aproximadamente 4 veces mayor para la preparación menos sialilada (no mostrada). Así, la presencia de la forma de isómero de NGNA de ácido siálico, como resultado de la expresión recombinante en una célula huésped de mieloma murino, sobre esta IgG1 humana redujo la avidez de los complejos inmunitarios para Fc γ R1II humano.

Unión de complejos inmunitarios a las células K562. Se mezclaron muestras de prueba de Ab1 con TNF humano marcado con 125 I en una relación molar 2:1 fija, y entonces cantidades variables del complejo inmunitario resultante se añadieron a 3×10^5 células K562 en una placa de cultivo de 96 pocillos. Una comparación de complejos de G2 de Ab1:TNF (Ab no sialilado) frente a complejos de G2S2(hi) de Ab1:TNF (Ab completamente sialilado) mostró que el Ab completamente sialilado se unió con mucha menos avidez, siendo la variante altamente sialilada requerida a concentraciones 10 veces mayores que la variante asialilada para lograr el mismo grado de unión (Fig. 4B). Estos resultados indican que la presencia del isómero NANA de ácido siálico, introducido por modificaciones enzimáticas *in vitro*, redujo la avidez del anticuerpo por Fc γ R1II humano que podría ser atribuible a una reducción en la afinidad de unión a la diana (TNF), haciendo así que los complejos de Ab:TNF fueran menos estables, reduciéndose la afinidad de la región constante por el receptor de Fc, o ambos.

Unión de Ab a Fc γ R1IIa celular. Para analizar la unión de Ab a Fc γ R1IIa sobre linfocitos citolíticos espontáneos (NK), se aislaron PBMC humanas como se ha descrito anteriormente, y los linfocitos NK se aislaron de PBMC por clasificación magnética de células usando un kit de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec). Se cultivaron linfocitos NK durante la noche en placas de 96 pocillos a 1×10^5 células por pocillo en medio DMEM con 10 % de FBS a 37 °C con 5 % de CO $_2$. Se marcó mAb anti-Fc γ R1IIa 3G8 22 (BD Biosciences Pharmingen) con 125 I usando tubos Iodogen (Pierce) a una actividad específica de 11 μ Ci/ μ g. El mAb yodado 3G8 se pre-mezcló con cantidades variables de Ab competidor sin marcar en DMEM, 10 % de FBS y la mezcla de Ab se añadió a los linfocitos NK para una concentración final de 0,3 μ g/ml de 3G8 yodado. Las células se incubaron a 4 °C durante 16 h y a continuación se eliminó la IgG sin unir lavando 4 veces con PBS. El número de CPM unidos a las células se determinó usando un contador gamma.

Células U-937 (no pre-tratadas para mejorar la expresión de Fc γ R) que se habían cultivado en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 10 % de FBS (medio U-937) se sembraron en

placas de 96 pocillos para tener 3×10^5 células por pocillo en 50 μ l de medio U-937. Se marcó Ab2 (IgG1 humana) con 125 I a una actividad específica de 17 μ Ci/ μ g. El Ab Ab2 yodado se pre-mezcló con cantidades variables de muestras de Ab2 competidor sin marcar en medio U-937. Entonces se añadieron 50 μ l de la mezcla de Ab a 50 μ l de células U-937 para tener una concentración final de 0,2 μ g/ml de Ab3 yodado en todos los pocillos. Las células se incubaron a 4 °C durante 16 h y el Ab sin unir se eliminó lavando tres veces con medio U-937. El número de CPM unidos a las células se determinó usando un contador gamma.

Para probar si variantes de Ab muestran afinidad diferencial por Fc γ R11a, se aislaron linfocitos NK recientemente aislados de donantes humanos sanos y se usaron en experimentos de unión por competición que implican mAb radiomarcado 3G8, un Ab anti-Fc γ R11a que compite por la unión con Fc, y Ab sin marcar como competidores. Se usaron Ab sin complejar libres en lugar de complejos inmunitarios (que generalmente muestran unión mucho mayor a Fc γ R11a) de manera que los resultados no se confundieran por diferencias en la estabilidad de los propios complejos inmunitarios solubles, que pueden influirse por el contenido de ácido siálico de Fc (los datos sin publicar de los presentes inventores). Los resultados mostraron que la variante natural más sialilada de Ab1, Ab1-29, tuvo una afinidad reducida por Fc γ R11a sobre los linfocitos NK, que se requiere a concentraciones 4 veces superiores que Ab1-20 para lograr el mismo grado de unión (Fig. 5A). Hubo una diferencia similar con las variantes naturales de Ab5, en las que Ab5-26 se requirió a concentraciones 5 veces superiores a Ab5-0 para competir contra el mAb 3G8 al mismo grado (Fig. 5B). Se obtuvieron resultados similares en cada experimento si se usan linfocitos NK de al menos otros dos donantes de sangre (datos no mostrados; alotipo de Fc γ R11a no determinado). Estos resultados mostraron que mayores niveles de sialilación pueden reducir la afinidad de IgG por Fc γ R11a y, por tanto, casi ciertamente contribuyeron a la reducción observada en la actividad de ADCC.

Cuando se hizo el mismo experimento con los pares de variantes derivados del fraccionamiento de la lectina, sin embargo, se observó que las variantes más sialiladas también se unieron a Fc γ R11a, y quizás ligeramente mejor, que las variantes menos sialiladas (Figuras 5C y 5D). No se conocen los motivos para los diferentes resultados con los dos pares de variantes naturales y dos pares de variantes derivadas de lectina, pero una buena posibilidad es que hay diferencias en las localizaciones de los residuos de ácido siálico que están presentes.

EJEMPLO 4: Ensayos de ADCC *in vitro*

Las células diana para el Ab anti-TNF comprendieron una línea de células de mieloma de ratón Sp2/0 que expresa establemente sobre su superficie TNF humano recombinante que sigue en una forma transmembranaria debido a la introducción de una delección de los aminoácidos 1-12 de TNF maduro (Perez et al., 1990). Se cultivaron células K2 en medios Iscove que contenían FBS inactivado con calor, L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y MHX. Se compraron medios de cultivo y suplementos de Gibco (Invitrogen). Las células se sometieron a pases 1:5 cada 2-3 días. En el día del ensayo, las células K2 se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS. Las células se ajustaron a aproximadamente 1×10^6 células/ml con el medio de cultivo y se añadieron 15 microlitros de reactivo de marcado fluorescente BATDA (en el kit de reactivo de toxicidad Delfia EuTDA, Perkin-Elmer Life Sciences) a 5 ml de células (Blomberg et al., 1996). Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, luego se lavaron dos veces con PBS a 1000 rpm, 5 min. Inmediatamente antes de la mezcla con células efectoras PBMC, las células diana se centrifugaron y se resuspendieron a 2×10^5 células/ml en medio Iscove que contenía 1 % de BSA.

Se aislaron células efectoras PBMC de donantes sanos después de recoger sangre en Vacutainers heparinizados y diluir dos veces con PBS. Treinta ml de sangre diluida se estratificaron encima de 15 ml de Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Suecia) en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1500 rpm, 30 min a temperatura ambiente (TA). Se recogió la interfase (capa leucocitaria) que contenía PBMC y se lavó dos veces con PBS y se centrifugó a 1200 rpm, 10 min, TA. Se resuspendieron células en medio Iscove que contenía 5 % de FBS inactivado con calor, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Las PBMC se activaron durante aproximadamente 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ incubando sobre placas de cultivo de tejido de 100 mm (Corning) que se habían recubierto con OKT3 (10 μ g/ml en PBS, Ortho Pharmaceutical) durante la noche a 4 °C y se aclararon con PBS. Las PBMC se recogieron, se lavaron una vez con medio Iscove que contenía 1 % de BSA; se contaron y se resuspendieron a aproximadamente 1×10^7 células/ml.

Muestras de prueba de Ab1, que incluyen la variante Gno de Ab1 de control negativo, se diluyeron sucesivamente en medios Iscove - 1 % de BSA. Se añadieron cincuenta microlitros de células diana (~10.000) y 100 microlitros de anticuerpo a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Corning). Se añadieron cincuenta (50) microlitros de células efectoras (~500.000 células) a la mezcla, y la placa se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min, TA. La relación de E:T fue normalmente 50:1, sin embargo, algunas veces se usó 35:1. Para la fluorescencia de fondo, los pocillos se incubaron con células efectoras, células diana y medios. Para la fluorescencia máxima, se añadieron 10 microlitros de disolución de lisis (del kit de toxicidad EuTDA Delfia) a los pocillos de fondo. Para el ensayo de ADCC, se incubaron células a 37 °C, 5 % de CO₂, durante aproximadamente 2 horas. Se transfirieron 20 microlitros de sobrenadante a una placa de fondo plano de 96 pocillos (Corning). Se añadieron 200 microlitros de disolución de europio (kit de toxicidad EuTDA Delfia) y la placa se puso sobre un agitador de placas durante 10 minutos a TA. La fluorescencia se midió en el fluorímetro resuelto en el tiempo, EnVision Instrument (Perkin-Elmer Life Sciences). El

porcentaje de lisis específica en cada muestra se calculó según la siguiente fórmula: % de liberación específica = $\frac{[\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}]}{[\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}]} \times 100$.

Las evaluaciones iniciales de los efectos del ácido siálico se basaron en la actividad de ADCC *in vitro* de los dos pares de variantes naturales. Ab1-29 y Ab1-20 se incubaron a concentraciones variables con células diana que expresan Ag1 marcados con europio. Como se muestra en la Figura 6A, hubo una clara diferencia en la actividad citotóxica, en la que Ab1-29, con mayores niveles de sialilación de Fc, se requirió a concentraciones aproximadamente 7 veces mayores que Ab1-20 con el fin de desencadenar la lisis de células al mismo grado. Los resultados mostraron que el sublote de Ab1 que se enriqueció para glicofomas sialiladas, MAAB de Ab1, fue menos potente que el PBS de Ab1 sin modificar. Se requirieron aproximadamente 3 veces más del material MAAB de Ab1-43 % para lograr la misma cantidad de lisis que la muestra de PBS de Ab1-29 %. Los experimentos con células diana que expresan Ag5 mostraron el mismo patrón para el par de variantes naturales de Ab2. Con el fin de lograr el mismo grado de lisis de células que la variante de Ab2-0 con ácido siálico no detectable, se requirió una concentración aproximadamente 6 veces mayor de Ab2-26 (como se muestra en la Figura 6B). Así, el efecto de la variación de la glicosilación natural en esta medida de ADCC no es específico de Ab o de diana.

En un experimento representativo para comparar la actividad de ADCC de sublotes de Ab1 que se diferencian en su contenido de ácido siálico tras un fraccionamiento basado en lectina, el MAAB de Ab1 (43 % sialilado) se comparó con el lote de Ab1 sin modificar del que se derivó (PBS de Ab1). En un segundo experimento para comparar sublotes de Ab1 que se diferenciaron en el contenido de ácido siálico, se compararon WGAT de Ab1 (29 % sialilado), WGAR de Ab1 (40 % sialilado) y WGAB de Ab1 (32 % sialilado) entre sí.

Los resultados del ensayo también demuestran una relación inversa entre el contenido de ácido siálico y la potencia en el ensayo de ADCC independientemente del modo en el que se preparó el Ab (Fig. 6C). Es decir, WGAT de Ab1, que contiene aproximadamente la misma cantidad de ácido siálico que el Ab1 sin modificar, mostró la misma actividad que el Ab1 sin modificar. Sin embargo, las fracciones preparadas con WGA perdieron potencia con contenido creciente de ácido siálico (Fig. 6C).

En un experimento, se compararon dos muestras con diferencias más profundas en el contenido de ácido siálico, G2 de Ab1 enzimáticamente modificada (0 % sialilado) y G2S2(hi) de Ab1 (~95 % sialilado). Se aislaron PBMC frescas por centrifugación por densidad en Ficoll-Paque. Se pre-incubaron 5×10^5 PBMC en un volumen de 100 ml durante aproximadamente 10 minutos con cantidades variables de Ab1 sin tratar, G2S2(hi) de Ab1 (completamente galactosilado y sialilado), o Ab7, un Ab de control negativo del mismo isotipo. Se usaron células K2 que expresan TNF humano recombinante unido a la superficie como las dianas marcando con 200 mCi de ^{51}Cr . Las células marcadas se añadieron a la mezcla de PBMC/Ab, se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se sabe que este tiempo de incubación (4 horas) revela principalmente la lisis de células inducida por linfocitos NK (dentro de la población de células PBMC), que expresan FcγRIIIA, en vez de por macrófagos, que generalmente expresan FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIIIA (CD16A). Entonces se determinó el número de radiactividad en los sobrenadantes de células usando Topcount. Los resultados mostrados (Fig. 6D) son representativos de dos experimentos independientes hechos usando PBMC de diferentes donantes y muestran un cambio de más de 10 veces en la potencia de la lisis celular entre el Ab que está completamente sialilado y el que está casi desialilado.

También se compararon otros pares de preparación de Ab en el ensayo de ADCC. Se evaluaron fracciones de lectina de WGA preparadas a partir de Ab2 galactosilado en ensayos de ADCC usando células diana que expresan Ag2. De nuevo, el material más sialilado fue menos activo, aunque hubo solo una diferencia de 4 veces en sus valores de CE₅₀ a pesar de su espectacular diferencia en contenido de ácido siálico (5 % frente al 67 %). Por comparación, las fracciones de lectina de WGA preparadas a partir de Ab1 mostraron el 41 % de variante sialilada que necesitaba estar a concentraciones aproximadamente 6 veces mayores que el 29 % de variante sialilada para lograr el mismo grado de lisis celular.

Estos resultados para los tres Ab tratados mostraron coherentemente que mayores niveles de ácido siálico de Fc se asociaron a actividad reducida de ADCC. Aunque no son cuantitativas, las diferencias entre el cambio de magnitud en la actividad de ADCC y en el contenido de ácido siálico de las preparaciones de Ab, hubo una relación coherente dentro del panel de cuatro variantes de Ab1, en las que los valores de CE₅₀ fueron normalmente 0,3 ng/ml, 2 ng/ml, 2 ng/ml y 10 ng/ml para Ab1-20, Ab1-29, Ab1-WGA-29 y Ab1-WGA-41, respectivamente. Los resultados con las fracciones de lectina también confirmaron que las preparaciones de Ab sialiladas contienen especies moleculares con niveles variables de actividad de ADCC. Es de notar que, con la excepción de Ab3-0 y Ab3-26, las variantes analizadas aquí tendieron a no mostrar diferencias en el nivel máximo de lisis logrado.

Como este método de medir la actividad de ADCC está principalmente mediado por linfocitos NK positivos para FcγRIIIA, los datos implican que, mientras que la presencia de ácido siálico en el oligosacárido de Fc mejora la unión a FcγRI, su presencia disminuye significativamente la unión a FcγRIIIA.

65 EJEMPLO 5: UNIÓN A RECEPTOR DE FC DE ALTA AFINIDAD CELULAR

Se midió la unión de los Ab de prueba que se diferenciaron en el contenido de ácido siálico a receptor de Fc de alta afinidad, Fc γ RI (CD64), usando un formato de unión por competición sobre células U-937, una línea celular monocítica humana. Se cultivaron las células U-937 en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 10 % de FBS en matraces T y se mantuvieron en una estufa de incubación con 5 % de CO₂ a 37 °C. El Ab2, un Ab quimérico de ratón/IgG1 humana, se yodó usando tubos de yodación previamente recubiertos con IODO-Gen a una actividad específica de 17,2 mCi/mg. Las células U-937 se resuspendieron a 6 x 10⁶ células/ml con medios de cultivo fresco, y luego se sembraron en placas de cultivo de tejido Millipore de 96 pocillos con filtros a una densidad de 3 x 10⁵ células por pocillos. Las células no se pretrataron para inducir mayor expresión de Fc γ R. El Ab2 yodado se premezcló con cantidades variables de competidor de mAb sin marcar (las muestras de prueba) usando medio de cultivo como diluyente, en un volumen de 50 μ l. Entonces, las mezclas se añadieron a un cultivo de 50 μ l de células U-937 dando una concentración de Ab2 final yodada de 0,2 ng/ml. Entonces, las células se incubaron a 4 °C durante 16 horas. El IgG sin unir se eliminó lavando con medio y aspirando tres veces usando una sistema a vacío de placas. El número de recuentos unidos a las células se determinó usando un contador gamma.

La Fig. 7A muestra que, en comparación con G2 de Ab1 (sin ácido siálico), G2S2(hi) de Ab1 (~95 % sialilado) se unió al FcR de alta afinidad (CD64) sobre células U-937 con afinidad 5 a 10 veces mayor, es decir, G2S2(hi) de Ab1 se requirió a solo de un quinto a un décimo de la concentración para dar el mismo grado de inhibición de la unión de Ab2 yodado. G2 de Ab1 no mostró diferencia detectable de Ab1 sin tratar (datos no mostrados), siendo el último una mezcla heterogénea de diferentes glicofomas, la mayoría de las cuales contienen menos galactosa (es decir, las glicofomas G0 y G1) que la muestra de G2 de Ab1.

La Fig. 7B muestra que dos lotes diferentes de Ab3 que se diferencian en la cantidad de especies de oligosacáridos cargadas (especies que contienen ácido siálico), que es tanto el 2 % del oligosacárido total como el 42 %, muestran similarmente que el lote caracterizado por tener mayor contenido de ácido siálico tiene mayor afinidad por Fc γ RI.

Después de observar la reducida unión a Fc γ RIIIa de linfocitos NK por preparaciones de anticuerpo con mayor contenido de ácido siálico para dos pares de variantes de glicosilación natural de Ab1 y Ab5 (Ejemplo 3, Fig. 5A y B), se consideró la posibilidad de que el efecto fuera debido a la simple repulsión electrostática entre el ácido siálico negativamente cargado y la superficie celular negativamente cargada. Sin embargo, el efecto inverso del contenido de ácido siálico sobre la afinidad de unión por el receptor Fc γ RI sobre células U-937 humanas no siguió el mismo patrón para Ab5 u otros Ab (datos no mostrados).

Debe observarse que, mientras que las dos muestras de Ab1 se diferencian en la ausencia/presencia de la forma NANA de ácido siálico, se cree que las dos muestras de Ab3 se diferencian en la cantidad de la forma NGNA de ácido siálico (producido en células huésped de ratón).

EJEMPLO 6: MEDICIÓN DE LA SEMIVIDA EN SUERO

En el presente ejemplo, una proteína de fusión que contiene Fc que comprende un péptido del extremo N fusionado con una secuencia de la región variable del anticuerpo y una bisagra de IgG1 humana, dominios CH2 y CH3 expresados en células de mieloma de ratón, se trató para formar la forma completamente sialilada (G2S2). Se administraron ratas CD1 hembra normales (4 por grupo de tratamiento) con una inyección intravenosa de tanto la forma sin modificar de FcP1, que contuvo oligosacáridos de Fc que estuvieron el 5 % sialilados, como la versión completamente sialilada (~98 % sialilada) se inyectaron por separado en grupos de ratas CD1 hembra intravenosamente. Se recogió la sangre por sangrados retro-orbitales a 1 hora, 5 horas, 24 horas, 72 horas, 7 días, 14 días y 21 días, y luego se hizo una extracción de sangre terminal por punción cardíaca de animales anestesiados con CO₂ en el día 28. Se preparó suero a partir de las muestras de sangre y la concentración de Fc humano en el suero se midió usando un ELISA colorimétrico. Brevemente, se recubrieron primero placas de EIA de 96 pocillos con anticuerpos policlonales de cabra anti-Fc humano. Se incubaron diluciones variables de las muestras de suero en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó proteína sin unir lavando, y el Fc humano unido se detectó usando anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con enzima, seguido de los sustratos de color apropiados.

Los resultados del estudio se muestran en la Fig. 8. El área calculada bajo la curva (ABC) fue 95 \pm 1,6 día-ng/ml X 10⁻³ para el anticuerpo sin modificar y 48 \pm 1,9 día-ng/ml X 10⁻³. Esto mostró que un mayor grado de sialilación en el oligosacárido de Fc se asoció a una tasa más rápida de eliminación en ratas normales.

En un segundo experimento, ratones normales se inyectaron con una dosis única de 3 mg/kg de Ab2 enzimáticamente modificado para estar tanto completamente asialilado (G2) como completamente sialilado (G2S2). Se monitorizó Fc humano en el suero y se midió usando ELISA colorimétrico como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 9. Después de un periodo de aproximadamente una semana, G2S2 de Ab2 empezó a aclararse más rápidamente del suero de los ratones y a los 20 días G2S2 de Ab2 que quedaba en el suero fue aproximadamente 1000 veces inferior a la concentración de Ab2-G2.

Aclareamiento de variantes de ácido siálico de Ab1 de la circulación sistémica en ratones. Se hizo otra medición directa del efecto del contenido de ácido siálico cuantificando la tasa de aclareamiento de especies de glicosilación individuales de suero después de la inyección de una muestra que contenía una mezcla heterogénea de especies de glicano unidas a un Ab1.

5 La misma preparación de Ab1 heterogéneamente glicosilada se inyectó i.p. en 18 ratones Balb/c normales de 8-10 semanas de edad a una dosis de 20 mg/kg. Se recogió la sangre de 6 ratones en el día 3, otros 6 ratones en el día 14 y los 6 ratones finales en el día 28. Se preparó suero de cada muestra de sangre y el Ab1 se re-purificó del suero usando una columna de afinidad anti-Id específica para regiones V de Ab1. Las estructuras de los glicanos de Fc de las muestras de Ab1 re-purificadas se analizaron entonces por análisis de HPLC y la proporción relativa de diversas glicofomas se determinó como se ha descrito previamente en el presente documento.

15 Se encontró que la glicofoma galactosilada que carece de ácido siálico (G2S0) mantiene su abundancia relativa durante el periodo de 4 semanas en los ratones, mientras que las glicofomas de Ab que contienen glicanos con 1 ácido siálico (G2S1) y las glicofomas con 2 ácidos siálicos (G2S2) se aclararon a una tasa mayor.

Así, proteínas completamente sialiladas que contienen Fc tiene una semivida en suero más corta que las composiciones asialiladas o parcialmente sialiladas.

20 EJEMPLO 7: CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO Y AVIDEZ DE ANTICUERPOS

Los resultados descritos en el presente documento respaldan la teoría de que el cambio en contenido de ácido siálico del glicano de Fc del dominio Fc (bisagra-CH2-CH3 dimerizado) afectará a la proteína entera. Con respecto a la bivalencia de anticuerpos y proteínas de fusión que comprenden un Fc glicosilado, los efectos pueden manifestarse en la avidéz de la proteína por una diana específica. Los experimentos en este ejemplo se realizaron para probar esta teoría y, además, demuestran el efecto específico del contenido de ácido siálico sobre la afinidad de unión a diana.

30 Unión a antígeno de la superficie celular. Las mismas líneas celulares que expresan Ag usadas en los ensayos de ADCC anteriormente descritos se usaron en ensayos de unión para probar diferencias entre variantes de ácido siálico en su avidéz de unión al antígeno. Se realizaron ensayos en un formato de competición, en el que uno de los Ab radiomarcados (tanto Ab1, Ab2 como Ab5), mantenido a una concentración fija, se incubó con las células que expresan Ag en presencia de cantidades variables de Ab de prueba sin marcar. Los Ab yodados, preparados por el método lodogen, estuvieron generalmente a una actividad específica de 10 uCi/ug.

35 Las células que expresan TNF superficial se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo, y las células que expresan Ag2 a 180.000 células por pocillos, en medio IMDM con 5 % de FBS. El Ab marcado con ¹²⁵I apropiado se mezcló con cantidades de valoración de los Ab de prueba y la mezcla se añadió a las células que expresan Ag apropiadas. Las placas se incubaron a TA durante 2 horas para permitir la unión del Ab a las células. Entonces, las células se lavaron tres veces con IMDM, 5 % de FBS para eliminar Ab sin unir, y el número de recuentos unidos a las células se determinó usando un contador gamma.

45 Para variantes de Ab5, células que expresan Ag5 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 186.000 células por pocillo en 50 µl de DMEM, 10 % de FBS. Se premezcló Ab2 marcado con ¹²⁵I con cantidades de valoración de Ab de prueba y se añadieron 50 µl de la mezcla a las células que expresan Ab. Las placas se incubaron a 4 °C durante 16 horas para permitir la unión del Ab al antígeno sobre las células. Entonces, las células se lavaron tres veces con DMEM, 10 % de FBS para eliminar el Ab sin unir, y se determinó el número de recuentos unidos a las células usando un contador gamma. Las muestras se probaron por duplicado o cuadruplicado, y los resultados mostrados son representativos de 3 ó 4 experimentos independientes. La diferencia en la unión entre estas muestras de prueba fue significativa (P < 0,0001 para los gráficos a, c, y d) como se ha determinado por la prueba F de la suma de cuadrados extra.

50 Los resultados se muestran en la Fig. 10A-D: unión por Ab1 radiomarcado a células que expresan Ag1 en presencia de variantes naturales de Ab1 sin marcar como competidores (Fig. 10A); unión por Ab5 radiomarcado a células que expresan Ag5 en presencia de variantes naturales de Ab5 sin marcar como competidores (Fig. 10B); unión por Ab1 radiomarcado a células que expresan Ag1 en presencia de variantes derivadas de lectina de Ab1 sin marcar como competidores (Fig. 10C); unión por Ab3 radiomarcado a células que expresan Ag3 en presencia de variantes derivadas de lectina de Ab3 sin marcar como competidores (Fig. 10D).

60 Unión de Ab a ligando en fase sólida. Se recubrió TNF soluble recombinante o anti-Id2 sobre placas de EIA añadiendo 50 µl de Ag o Ab anti-Id a 1 µg/ml en PBS a cada pocillo e incubando las placas a 4 °C durante la noche. Los pocillos se lavaron y a continuación se pre-trataron con 50 µl de 1 % de BSA, 0,125 % de gelatina en PBS durante 1 hora a TA para minimizar la unión no específica. El Ab1 marcado con ¹²⁵I o Ab3 marcado con ¹²⁵I se premezcló con cantidades de valoración de preparaciones de Ab de prueba respectivas en IMDM, 5 % de FBS y se añadieron 50 µl de la mezcla a los pocillos recubiertos con diana. La concentración final de Ab radiomarcado fue 100 ng/ml en todos los pocillos. Las placas se incubaron a TA durante 2 horas para permitir la unión del Ab a las dianas

65

recubiertas. Los pocillos se lavaron para eliminar el Ab sin unir y se determino el número de recuentos unidos usando un contador gamma.

Unión de los Ab recubiertos en placa a antígeno soluble. Se recubrieron placas de 96 pocillos con variantes de ácido siálico de Ab1 o Ab3 y a continuación se incubaron con cantidades variables de antígeno soluble radiomarcado del siguiente modo: (a) unión de Ag1 soluble radiomarcado a variantes naturales de Ab1 recubiertas en placa, (b) unión de Ag1 soluble radiomarcado a variantes fraccionadas de lectina de Ab1 recubiertas en placa, y (c) unión de Ag3 soluble radiomarcado a variantes fraccionadas de lectina de Ab3 recubiertas en placa. Las incubaciones en paralelo con Ag radiomarcado y Ag sin marcar en exceso 100 de veces se hicieron para determinar la unión no específica. Se probaron muestras por triplicado. Las variantes de Ab2 no se analizaron debido a la falta de disponibilidad de Ag2 soluble.

Análisis estadísticos. Se analizó una diferencia en la potencia entre las variantes de anticuerpo por comparación de las curvas usando regresiones logísticas de 4 parámetros simultáneas con un mínimo común, máximo y pendiente siguiendo una prueba preliminar para la pendiente e intervalo dada una meseta común para una concentración cero (es decir, asumiendo siempre sin probar un "pie" común para aumentar las curvas y cima común para disminuir las curvas). Se hizo prueba de significancia con la prueba F de la suma de cuadrados extra en GraphPad Prism v4. Se consideró que un valor de $P < 0,05$ era significativo. Los análisis sobre CPM se ponderaron inversamente por CPM^2 debido a que la desviación estándar de CPM aumenta proporcionalmente a su media (es decir, el coeficiente de variación de CPM, CV no está relacionado con la media).

Resultados

Experimentos de unión al antígeno realizados en un formato de competición con las mismas células diana que expresan Ag que se usaron en los ensayos de ADCC mostraron inesperadamente que el Ab1-29 se unía coherentemente al antígeno de la superficie celular con aproximadamente 3 veces menos afinidad que Ab1-20 (Fig. 10A). Ab5-26, a diferencia, mostró una afinidad que era indistinguible de Ab5-0 (Fig. 10B). Los mismos análisis realizados con los dos pares de variantes derivados de lectina mostraron resultados similares a las variantes naturales de Ab1, es decir, se requirió el Ab1-WGA-41 más sialilado a concentraciones 4 a 6 veces mayores que el Ab1-WGA-29 menos sialilado para lograr el mismo grado de unión competitiva (Fig. 10C), y se requirió el Ab2-GT-WGA-67 más sialilado a concentraciones 4 a 6 veces mayores que el Ab2-GT-WGA-5 menos sialilado (Fig. 10D).

De forma interesante, también se observó el mismo patrón de unión reducida por variantes de Ab1 y Ab2 con mayores cantidades de sialilación en experimentos que analizan la unión a dianas (antígeno recombinante soluble o Ab anti-Id) que se inmovilizaron sobre placas de EIA de 96 pocillos (Fig. 11A y B). Estos resultados mostraron que las diferencias en el grado de sialilación de Fc pueden afectar la unión al antígeno, además de a $Fc\gamma RIII A$, pero que el grado de sialilación no afecta la unión al antígeno de todos los Ab.

De los datos sobre la unión a diana inmovilizada, se cree que el aumento de la sialilación de Fc puede servir para reducir la flexibilidad de la región bisagra de Ab. En el caso de la unión de Ab1 y Ab2 a antígeno de la superficie celular, la reducida flexibilidad de la bisagra podría conducir a unión más monovalente y unión menos bivalente (alta avidéz) al antígeno dependiendo de la separación de epítopes de antígeno sobre el soporte sólido o superficie celular. La región bisagra de Ab5 también puede tener flexibilidad reducida, pero puede no necesitarse flexibilidad para este Ab para lograr la máxima unión a Ag5.

Con el fin de diferenciar entre si los efectos de flexibilidad de Ab o los cambios en la afinidad de unión intrínseca estuvieron afectados o no por la sialilación de Fc, la unión de Ab a ligando soluble se probó como una medida de la afinidad de unión puramente monovalente. Los resultados de hecho mostraron que para los tres pares de variantes de ácido siálico que mostraron diferencias en la unión a antígeno de superficie celular, no hubo diferencias detectables observadas entre pares de variantes en su unión a dianas solubles (Fig. 12A-C). Tomados conjuntamente, estos resultados demostraron que las diferencias en la unión a dianas inmovilizadas (superficie celular o recubiertas en placa) no fueron debidas a diferencias en la afinidad intrínseca entre cada brazo de Fab y la diana. Por tanto, las diferencias entre las variantes de ácido siálico de Ab1 y Ab2 en su unión a dianas inmovilizadas son debidas a diferencias en el grado de unión bivalente a las células.

Será evidente que la invención puede ponerse en práctica de otro modo distinto al particularmente descrito en la descripción y ejemplos anteriores. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas anteriores.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc, que comprende alterar la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc en la glicofoma sialilada G2S2, en el que la sialilación aumenta en la región Fc, en el que la sialilación se altera de la región Fc no mutante por tratamiento enzimático o modificación enzimática de la molécula por una α -(2,3)-sialiltransferasa, y en el que las propiedades controladas están seleccionadas del grupo que consiste en afinidad por uno o más de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad de ADCC, activación de macrófagos o monocitos, semivida en suero y avidéz.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula que contiene Fc tiene un dominio de unión específico para una diana, siendo la diana una diana inmovilizada.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula que contiene Fc tiene un dominio de unión específico para una diana, siendo la diana expresada sobre la superficie de una célula.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula que contiene Fc es un anticuerpo.
- 20 5. Un método *in vitro* para controlar las propiedades de una proteína terapéutica que contiene Fc caracterizada por tener un oligosacárido biantenarico covalentemente unido a un residuo de asparagina en el dominio CH2 de inmunoglobulina de dicha proteína, que comprende convertir una proteína terapéutica que contiene Fc no de la glicofoma G2S2 en un oligosacárido que es de la glicofoma sialilada G2S2, en el que la etapa de conversión comprende usar una α -(2,3)-sialiltransferasa para añadir residuos de ácido siálico, y en el que dicha proteína que contiene Fc tiene una o más de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en afinidad reducida por Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad reducida en ensayos de ADCC mediados por linfocitos NK, afinidad mejorada por Fc γ RI, capacidad mejorada para activar macrófagos y semivida en suero más corta en comparación con la misma proteína terapéutica que contiene Fc no de la glicofoma G2S2.
- 25 6. Una proteína que contiene Fc producida o alterada por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 30 7. Una proteína terapéutica que contiene Fc caracterizada por tener un oligosacárido biantenarico covalentemente unido a un residuo de asparagina en el dominio CH2 de inmunoglobulina de dicha proteína que es de la glicofoma sialilada de α -(2,3) G2S2, en la que dicha proteína que contiene Fc tiene afinidad reducida por Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA, actividad reducida en ensayos de ADCC mediados por linfocitos NK, afinidad mejorada por Fc γ RI, capacidad mejorada para activar macrófagos y semivida en suero más corta en comparación con una preparación de la misma proteína terapéutica que contiene Fc en las glicofomas no sialiladas G0, G1 o G2.
- 35 8. La proteína de la reivindicación 7, en la que la diana unida por el dominio de unión a diana de la proteína es una diana inmovilizada.
- 40 9. La proteína de la reivindicación 7, en la que la diana unida por el dominio de unión de la proteína se expresa sobre la superficie de una célula.
- 45 10. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que la proteína se indica para el tratamiento de trastornos relacionados con la oncología, enfermedades crónicas o enfermedades infecciosas.
- 50 11. La proteína de la reivindicación 10, en la que las enfermedades infecciosas implican aclaramiento mediado por FcR de células opsonizadas por anticuerpos o partículas que comprenden uno o ambos de los virus y bacterias y las enfermedades crónicas que requieren tratamiento a largo plazo.
- 55 12. La proteína de la reivindicación 7, en la que la proteína comprende un anticuerpo monoclonal recombinantemente expresado o un anticuerpo enzimáticamente modificado usando sialiltransferasas.
13. La proteína de la reivindicación 7, en la que la proteína está seleccionada del grupo que consiste en Ab1, Ab2, Ab3 o Ab5.
- 60 14. Un método *in vitro* para preparar un lote de proteína recombinante terapéutica que contiene Fc de la glicofoma sialilada G2S2 caracterizada por comprender un dominio de isotipo IgG de inmunoglobulina de al menos una región bisagra, dominio CH2 y CH3, en el que el método comprende tratar el lote con una enzima α -(2,3)-sialiltransferasa para añadir residuos de ácido siálico a las cadenas de polisacárido unidas a dicha proteína.
- 65 15. Una composición farmacéutica que comprende una proteína producida por el método de la reivindicación 14 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. La proteína producida por el método de la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección.

17. La proteína producida por el método de la reivindicación 14 para su uso *in vivo* en el diagnóstico de una enfermedad o afección.

5 18. La proteína de la reivindicación 16, en la que dicha proteína se usa para tratar una enfermedad neoplásica seleccionada del grupo que consiste en un carcinoma, un linfoma, un sarcoma y un mieloma.

10 19. La proteína de la reivindicación 16, en la que dicha proteína se usa para tratar un trastorno inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico.

20. La proteína de la reivindicación 16, en la que la proteína se usa para tratar trastornos que implican neovascularización de la córnea o de la retina.

15 21. Un método *in vitro* para controlar una afinidad de unión por una diana de una molécula que contiene Fc que tiene un dominio de unión específico para la diana, que comprende alterar la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc en la glicofoma sialilada G2S2, en el que la sialilación aumenta en la región Fc y la avidéz disminuye, y en el que la sialilación se altera de la región Fc no mutante por tratamiento enzimático o modificación enzimática de la molécula con una α -(2,3)-sialiltransferasa.

20 22. El método de la reivindicación 21, en el que la diana es una diana inmovilizada.

23. El método de la reivindicación 21, en el que la diana se expresa sobre la superficie de una célula

25 24. El método de la reivindicación 21, en el que la molécula que contiene Fc es un anticuerpo.

25 25. Un método *in vitro* que comprende la proteína producida por el método de la reivindicación 14 para diagnosticar una enfermedad o afección.

30

35

40

45

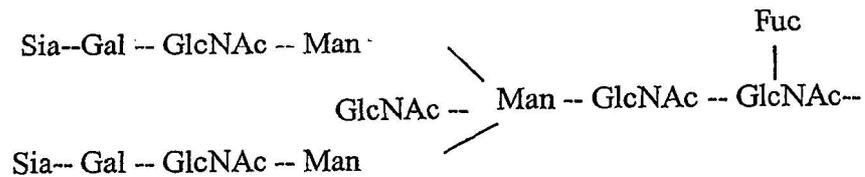
50

55

60

65

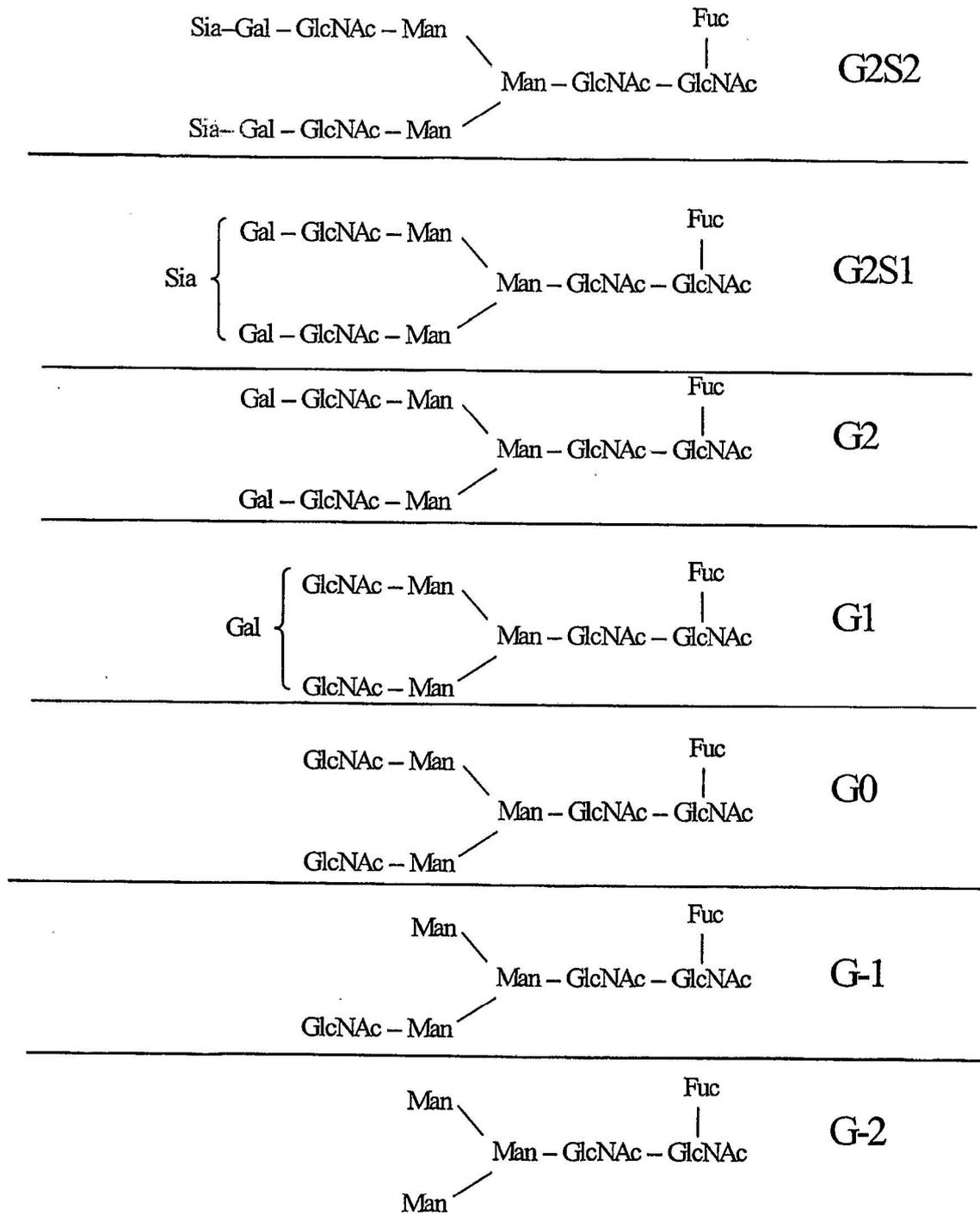
Figura 1



Fuc = fucosil; Gal = galactosil; Glc = glucosil; GlcNAc = N-acetilglucosaminil; Man = manosil; y Sia* = sialil (NANA, N-acetilneuraminil).

*Sia, ácido siálico, que es típicamente NANA, ácido 5-N-acetilnuramínico (NeuAc) o NGNA, ácido 5-N-glicolneuramínico (NeuGc). Se han encontrado otros ácidos siálicos o pueden sintetizarse químicamente.

Figura 2



Leyenda la misma que para la Fig. 1

Figura 3

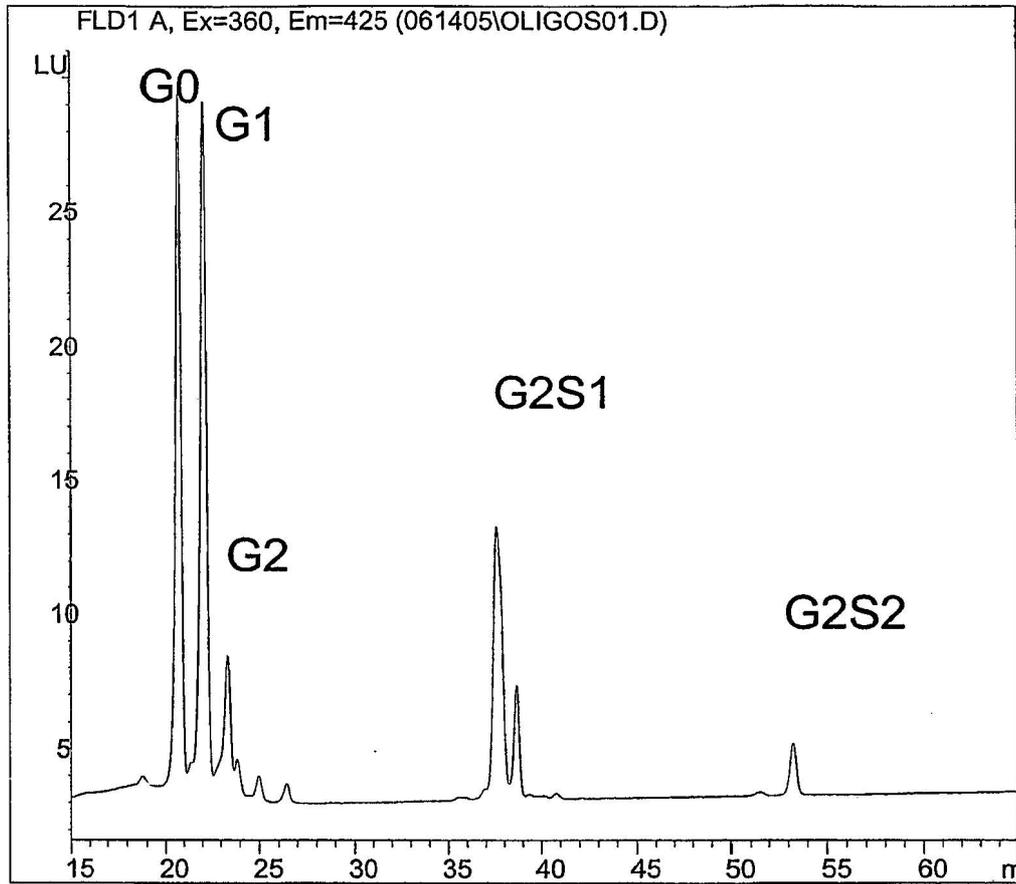
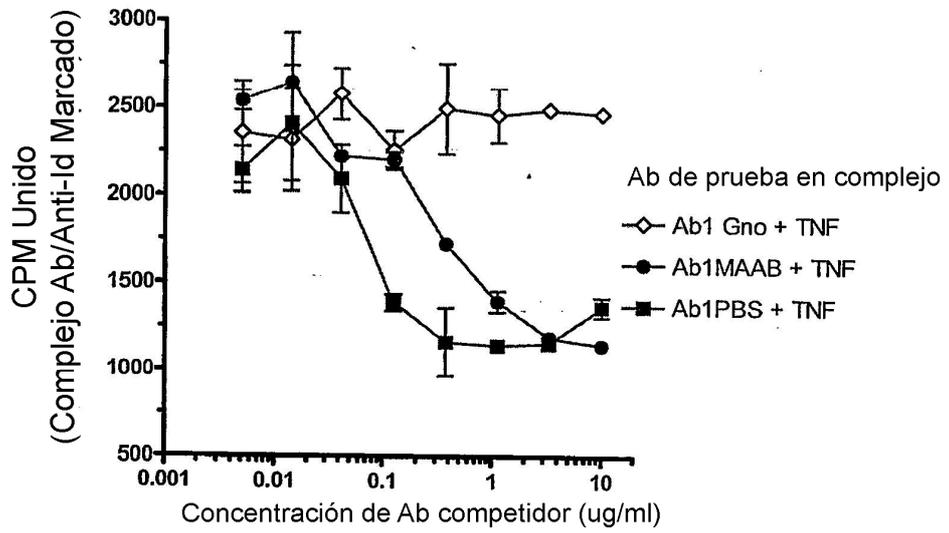


Figura 4

A)



B)

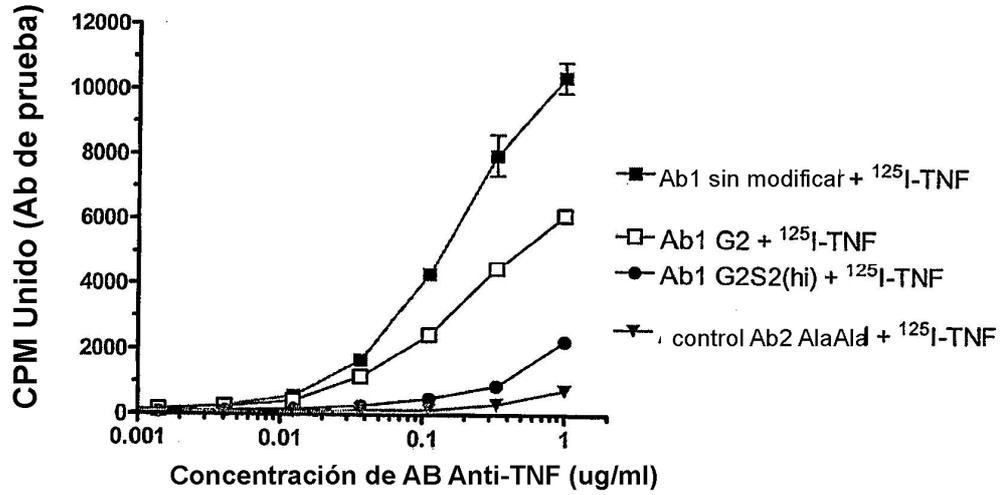


Figura 5

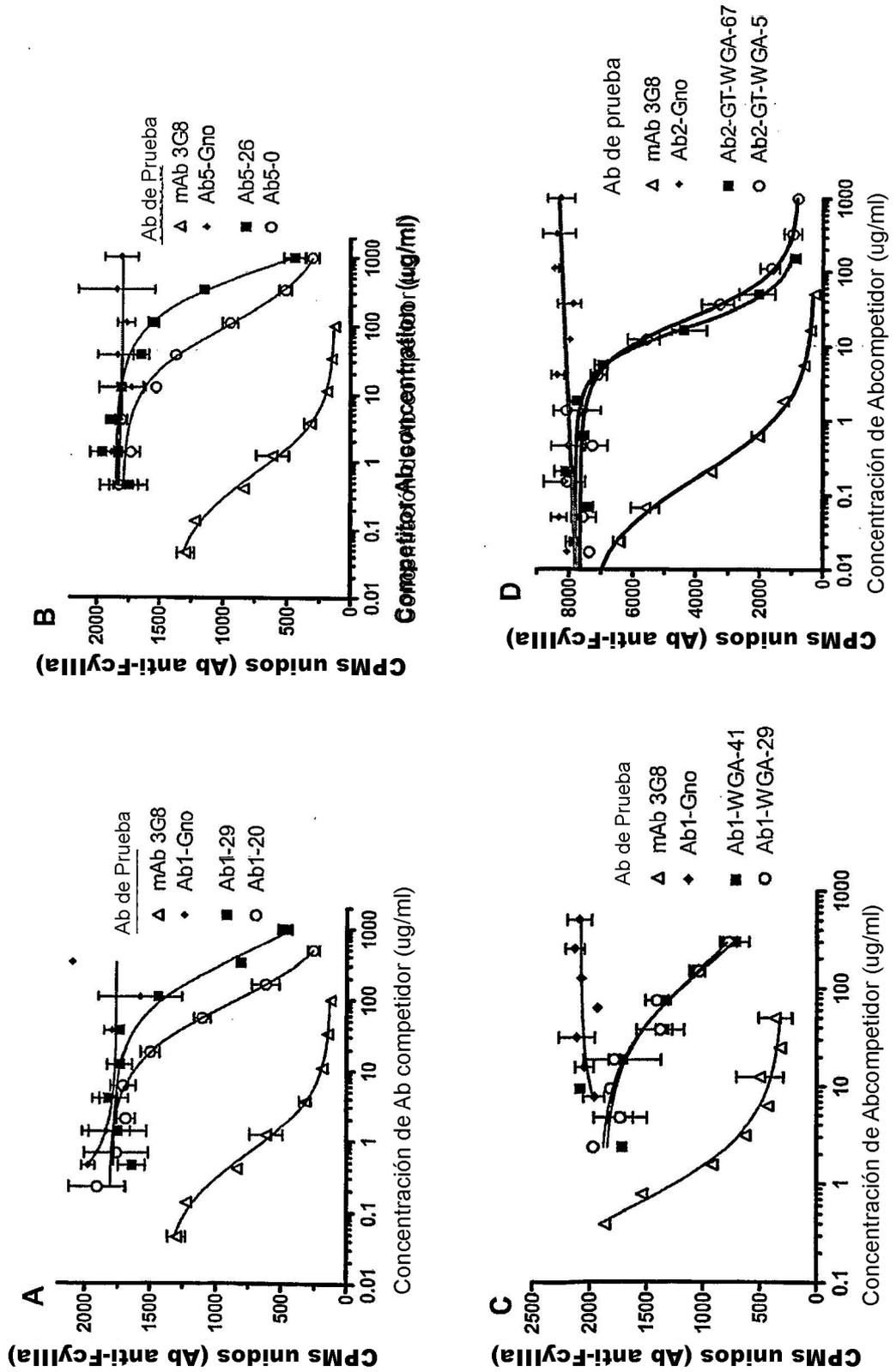


Figura 6

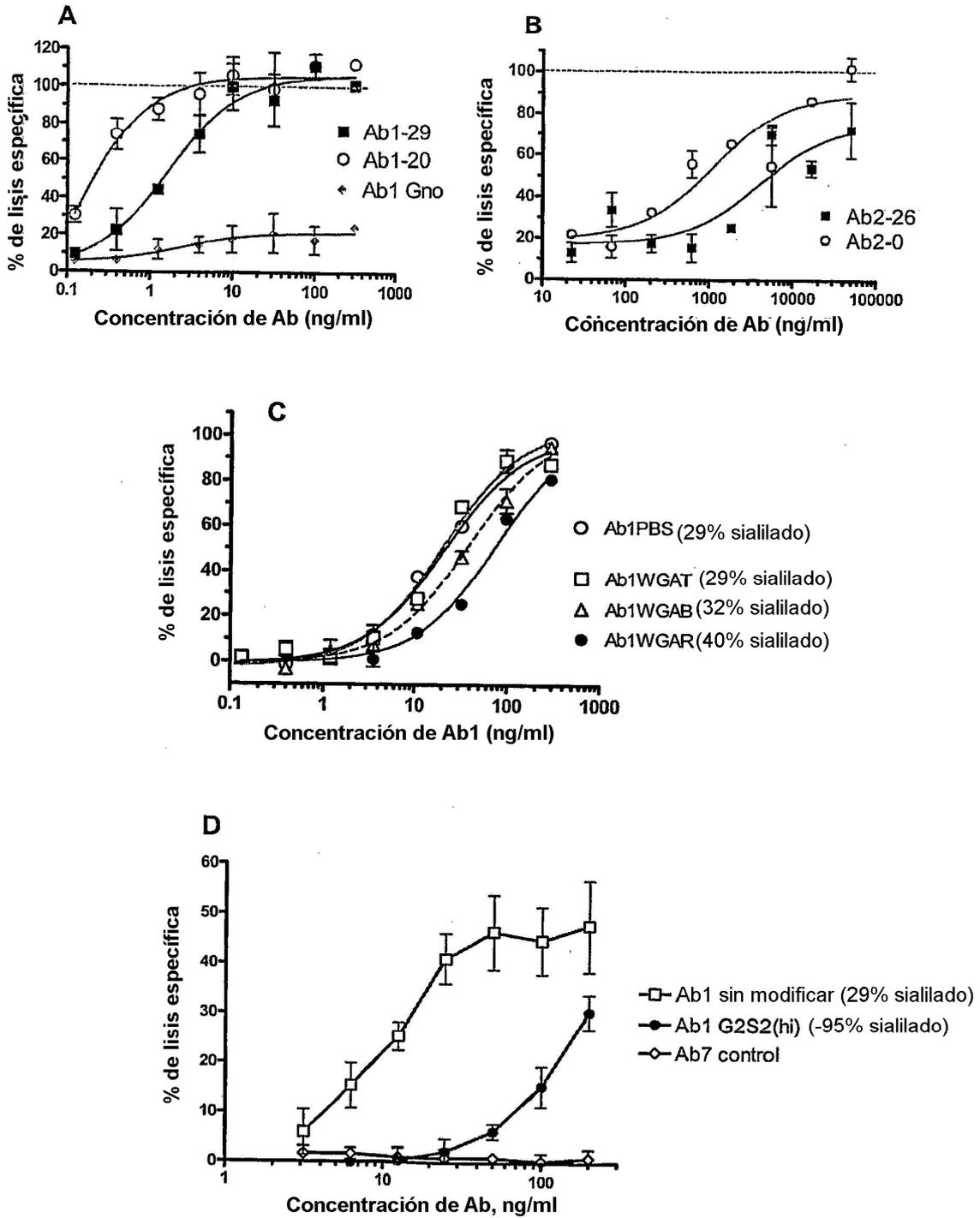
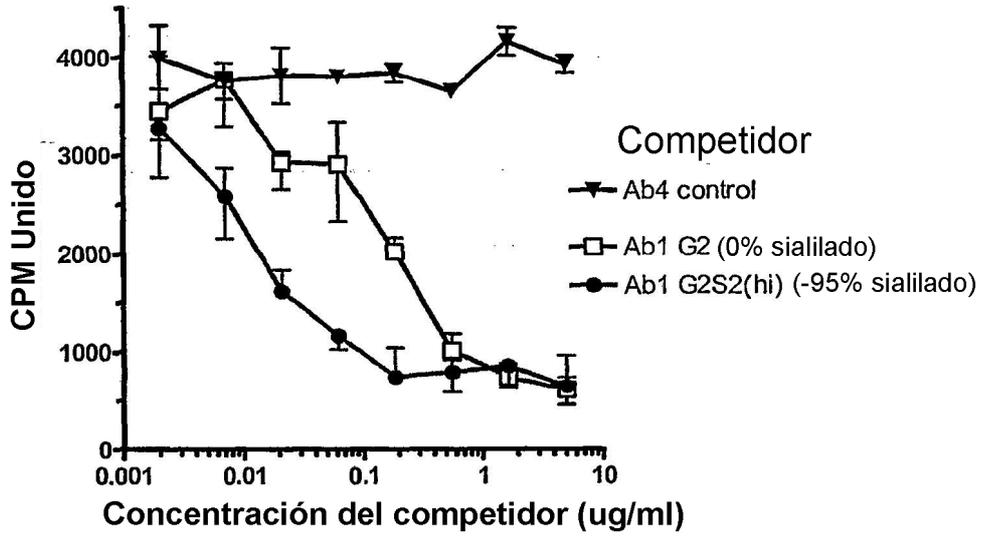


Figura 7

A)



B)

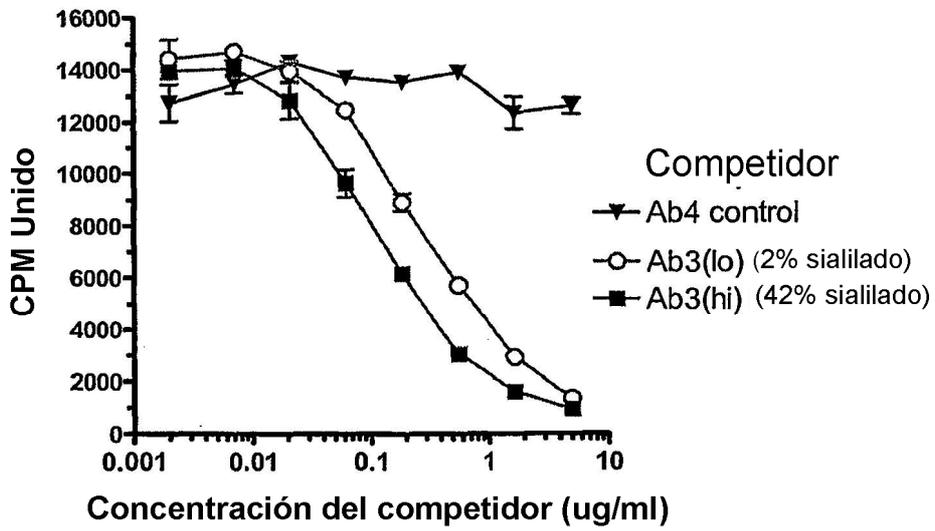


Figura 8

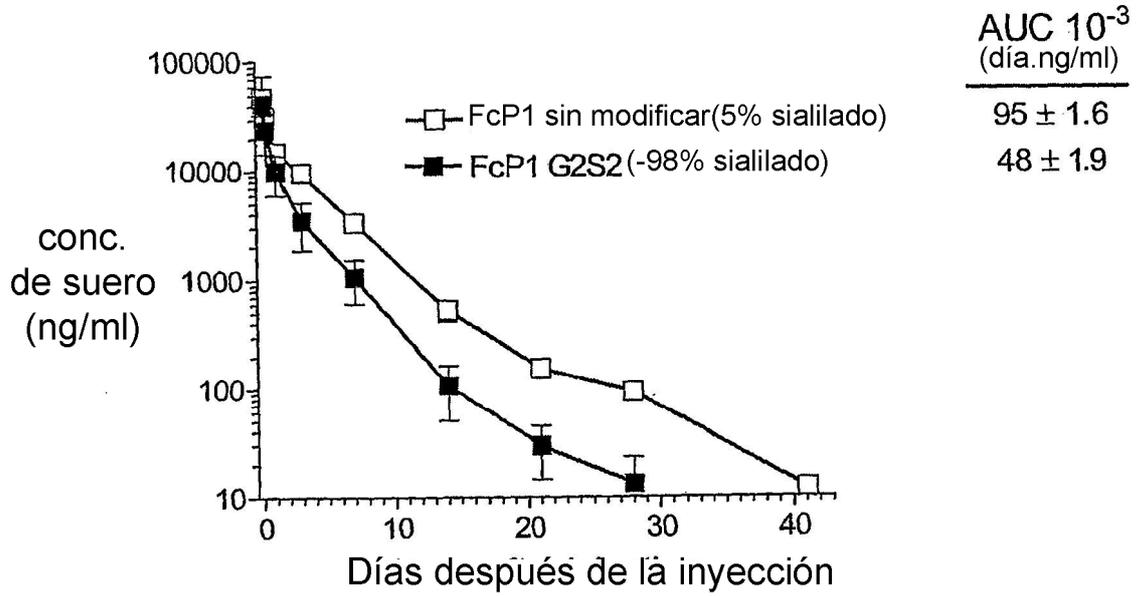


Figura 9

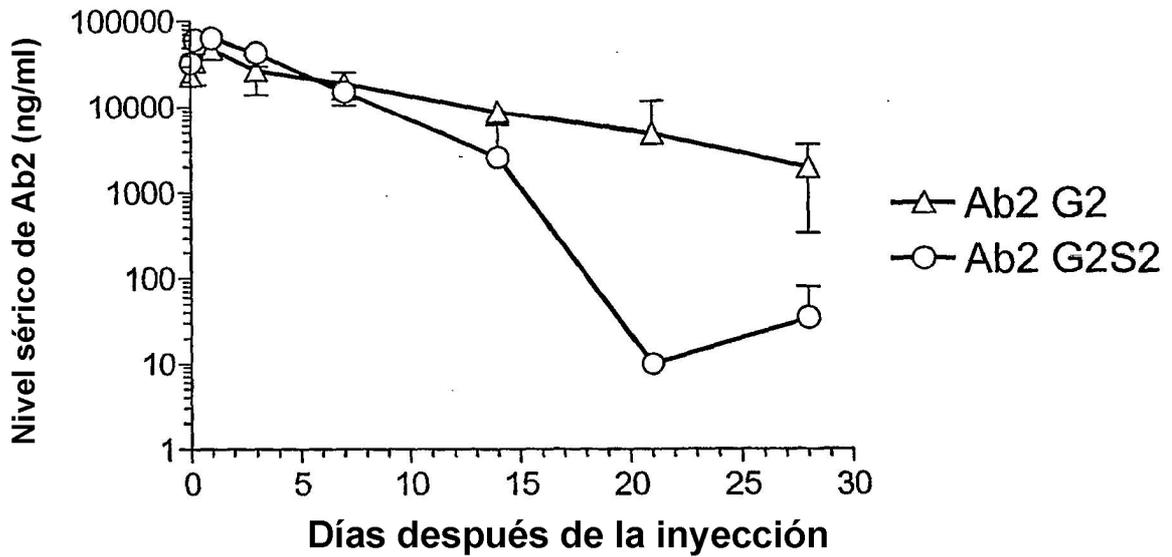


Figura 10

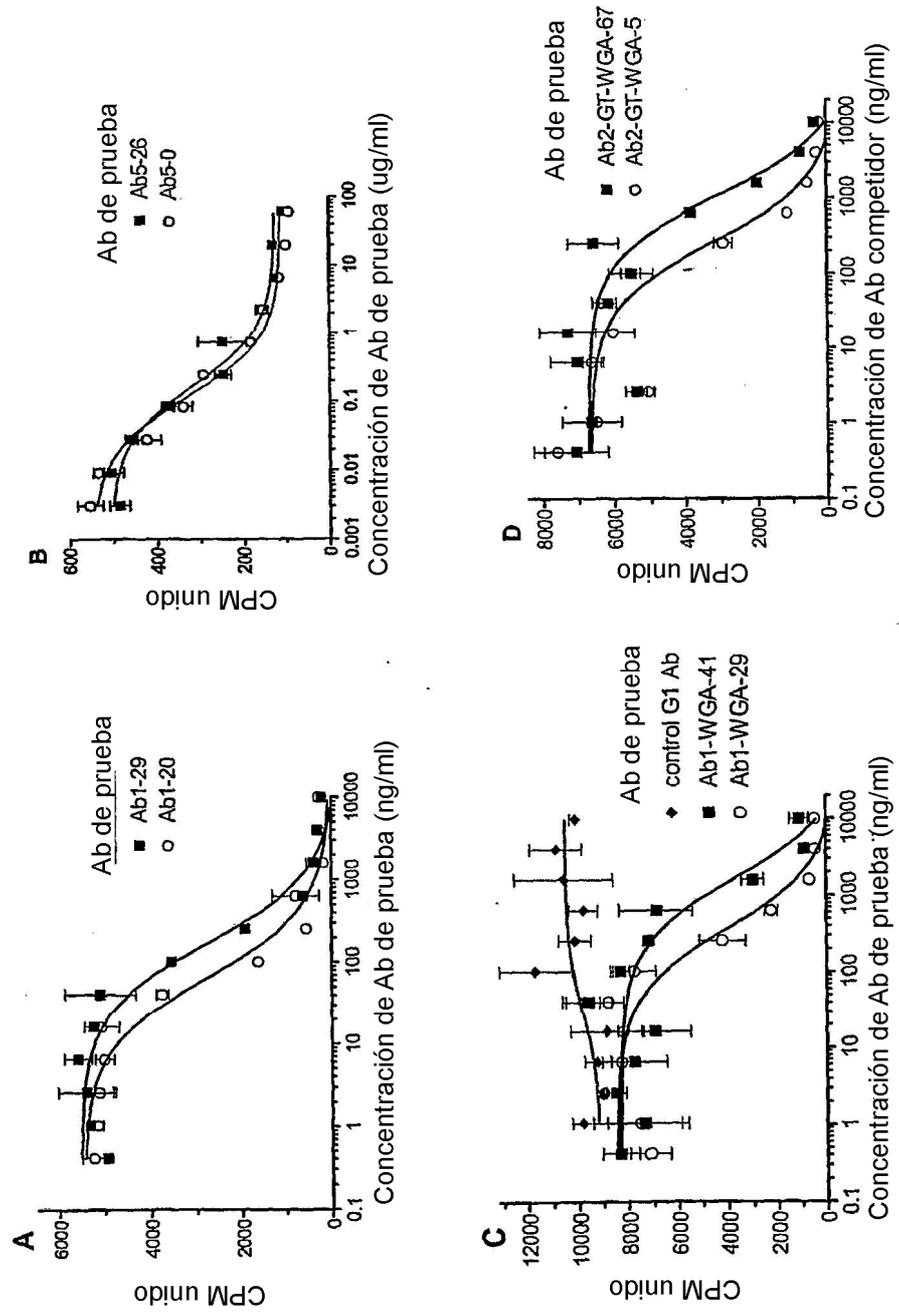


Figura 11

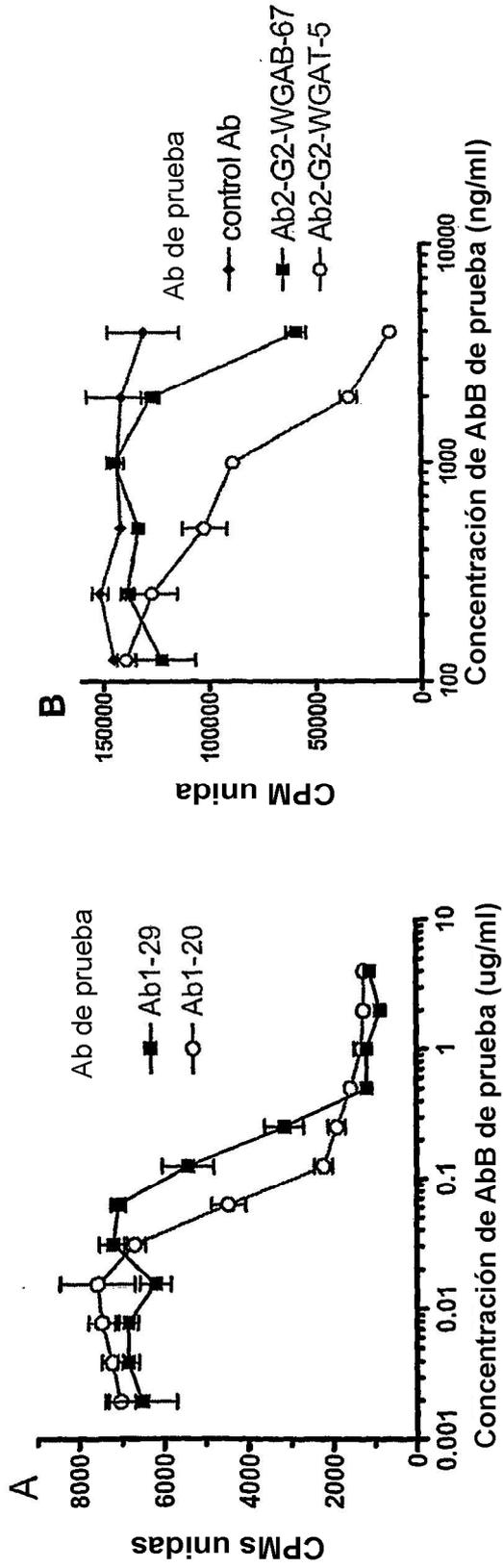


Figura 12

