

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 304**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2011 PCT/EP2011/063791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12020065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11760415 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2603528**

54 Título: **Anticuerpos con el fragmento Fab glicosilado**

30 Prioridad:

10.08.2010 WO PCT/EP2010/004878

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

13.03.2017

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**GOLETZ, STEFFEN;
DANIELCZYK, ANTJE y
STOECKL, LARS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 605 304 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos con el fragmento Fab glicosilado

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de los anticuerpos. En particular, se proporcionan anticuerpos que tienen glicanos altamente sialilados unidos a su parte Fab. Además, la presente invención proporciona un método para controlar la vida media en circulación de los anticuerpos a través de su sialilación del fragmento Fab.

Antecedentes de la invención

10 Hoy en día, los anticuerpos son agentes ampliamente utilizados en el campo de la medicina y la investigación. En medicina, encuentran aplicación en muchos campos diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos se utilizan como agentes etiquetadores para la detección de ciertos marcadores que permiten el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades o la determinación de parámetros específicos del cuerpo, tales como, por ejemplo, la presencia o concentración de ciertas hormonas.

15 Además, los anticuerpos también se utilizan como agentes terapéuticos en el tratamiento y profilaxis de una variedad de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, degeneración macular, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, y las infecciones virales. En estas terapias, el anticuerpo puede poseer actividad terapéutica por sí mismo, por ejemplo, bloqueando receptores o moléculas mensajeras, inhibiendo de este modo sus funciones relevantes de la enfermedad, o mediante el reclutamiento y la activación de los componentes del sistema inmune del paciente. Alternativamente, el anticuerpo puede acoplarse a otro agente que tiene actividad terapéutica. En particular en el tratamiento de cáncer y de infecciones, dicho agente adicional tiene como actividad 20 matar células y puede ser, por ejemplo, un radioisótopo o una citotoxina. En otra aplicación, pueden ser utilizados los anticuerpos para inmunizar pasivamente a un paciente mediante la transferencia de anticuerpos adecuados en la circulación del paciente.

Un aspecto crítico de la aplicación in vivo de anticuerpos, en particular, de su uso terapéutico, es el tiempo que los anticuerpos permanecen en el cuerpo del paciente, es decir, la vida media en circulación de los anticuerpos.

25 Muchos enfoques para aumentar la vida media en circulación de proteínas implican modificaciones artificiales de las proteínas tales como su conjugación con otras moléculas que aumentan la vida media o su fusión con otras proteínas o péptidos que aumentan su vida media. Sin embargo, estos enfoques implican ciertas desventajas. Normalmente requieren de complicados procesos de producción y con frecuencia existen problemas con su biocompatibilidad o aprobación farmacéutica. Además, estas modificaciones son a menudo perjudiciales para las actividades biológicas de los anticuerpos, en particular, sus propiedades de unión al antígeno y su señalización secuencia abajo tal como la citotoxicidad mediada por células que depende del anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad que depende del complemento (CDC).

35 Además, con respecto a glicoproteínas tales como la FSH en algunos casos la cantidad de ácidos siálicos unidos a las cadenas de hidratos de carbono de las glicoproteínas influye en la velocidad de eliminación y, por tanto, en la vida media en circulación de la glicoproteína. Sin embargo, de acuerdo con el estado de la técnica, este principio no se puede atribuir a los anticuerpos. En primer lugar, un alto grado de sialilación de la cadena de hidrato de carbono unida a la región Fc de un anticuerpo IgG afecta negativamente las actividades biológicas del anticuerpo. En particular, la ADCC del anticuerpo se reduce en gran medida debido a una disminución de la afinidad de la región Fc por el respectivo receptor Fc (véase, por ejemplo, Scallon, BJ y colaboradores (2006) *Molecular Immunology* 44, 1524-1534). Además, se 40 considera que el grado de sialilación de las cadenas de hidrato de carbono unidas a sitios de glicosilación en la región Fab no tiene ningún impacto en la vida media en circulación del anticuerpo, sino que más bien influye en la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Huang, L. y colaboradores (2006) *Analytical Biochemistry* 349, 197-207, Millward, TA y colaboradores (2008) *Biologicals*, 36, 41-47, Jefferis, R. (2009) *Methods in Molecular Biology* 483, 223-238, y Solá, RJ y colaboradores (2010) *Biodrugs* 24, 9-21).

45 Además, también los anticuerpos que tienen una baja vida media en circulación son importantes para algunas aplicaciones. Por ejemplo, para fines de diagnóstico, utilizando métodos de formación de imágenes radiactivas, se usan anticuerpos conjugados con radionúclidos. Puesto que el procedimiento de formación de imágenes se puede realizar en un tiempo relativamente corto y los radionúclidos conjugados con los anticuerpos tienen ciertos efectos secundarios adversos, una rápida eliminación del conjugado de la circulación del paciente es ventajosa.

50 Por lo tanto, se requiere en la técnica regular, en particular aumentar o disminuir, la vida media en circulación de los anticuerpos, en particular anticuerpos terapéuticamente o diagnósticamente útiles, sin necesidad de utilizar conjugados químicos o proteínas de fusión.

Resumen de la invención

- 5 Los presentes inventores han encontrado que la cantidad de ácidos siálicos en cadenas de hidrato de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab de los anticuerpos, influye en gran medida en la vida media en circulación de los anticuerpos. Este principio se puede utilizar para controlar la vida media en circulación y, por tanto, la biodisponibilidad de los anticuerpos, en particular de anticuerpos terapéutica o diagnósticamente útiles. Para poder ajustar individualmente la vida media en circulación de los anticuerpos es ventajoso, por ejemplo, optimizar la eficacia terapéutica y el equilibrio del efecto terapéutico y los posibles efectos secundarios adversos de los anticuerpos. Además, es ventajoso para fines de diagnóstico ajustar la vida media en circulación de los anticuerpos hasta un nivel bajo con el fin de evitar los efectos secundarios adversos.
- 10 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención está dirigida a un método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende la etapa de
- (a) para aumentar la vida media en circulación
- (a1) el aumento en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos;
- 15 y/o
- (a2) la disminución en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; o
- 20 (b) para la disminución de la vida media en circulación
- (b1) la disminución de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; y/o
- 25 (b2) el aumento en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos;
- en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) los fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidas entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.
- 30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición del anticuerpos que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos, caracterizada porque los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprenden al menos un sitio de glicosilación presente en su parte Fab, y caracterizado porque en la composición al menos 65% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos un residuo terminal de ácido siálico y/o menos de 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos dos unidades de galactosa libres; en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada la pesada y la cadena ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos
- 40
- 45
- 50

5 covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidas covalentemente entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir en forma intermolecular pero no intramolecular. Además, la presente invención proporciona composiciones de anticuerpos específicos y su uso en medicina.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una composición del anticuerpos que comprende un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una vida media deseada en circulación, que comprende la etapa de expresar dicho anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo en una célula huésped, en donde el método para controlar la vida media del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención se realiza utilizando la etapa (a1), la etapa (a2), la etapa (b1) o la etapa (b2) de dicha método.

15 En realizaciones preferidas, los anticuerpos proporcionados por la presente invención adicionalmente tienen una capacidad muy mejorada para inducir las diferentes actividades del sistema inmune, en particular, ADCC. Esto se logra mediante el patrón de glicosilación optimizado de los anticuerpos, lo que resulta - además de la vida media en circulación controlada - en una actividad mejorada de los anticuerpos, en particular, una unión y activación mejorada del receptor de Fc. Por lo tanto, la presente invención proporciona en un aspecto adicional composiciones de anticuerpos que comprenden anticuerpos que tienen una mayor vida media en circulación y una actividad mejorada de ADCC, así como un método para producir tales anticuerpos. Estos anticuerpos son particularmente adecuados para uso terapéutico, ya que su biodisponibilidad así como su actividad biológica se incrementan, y ambos contribuyen a un aumento de la eficacia terapéutica. Por lo tanto, otra ventaja de la presente invención es la capacidad de proporcionar anticuerpos que tienen al mismo tiempo un aumento de la vida media en circulación y una mayor actividad biológica. El aumento de la vida media en circulación se consigue preferiblemente por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Además, el aumento de la actividad biológica preferiblemente es un aumento de la actividad de ADCC, en particular como resultado de una unión más fuerte a los respectivos receptores de Fc. Tal aumento de la actividad de ADCC se puede lograr, en particular, mediante la optimización del patrón de glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, reduciendo la cantidad de residuos de fucosa en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fc de los anticuerpos.

25 Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas, y ejemplos específicos, que indican formas de realización preferidas de la solicitud, se dan a modo de ilustración solamente. Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención descrita serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la lectura de lo siguiente.

Definiciones

35 Como se usa en el presente documento, las expresiones siguientes tienen por objeto en general tener preferiblemente los significados que se exponen a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

40 La expresión "comprende", como se usa en este documento, además de su significado literal también incluye y específicamente se refiere a las expresiones "consiste esencialmente en" y "consiste en". Por lo tanto, la expresión "comprende" se refiere a realizaciones en las que el objeto que "comprende" los elementos enumerados específicamente no comprende otros elementos, así como realizaciones en las que el objeto que "comprende" elementos enumerados específicamente puede y/o, de hecho abarca otros elementos. Del mismo modo, la expresión "tiene" debe entenderse como la expresión "comprende", que también incluye y se refiere específicamente a las expresiones "consiste esencialmente en" y "consistir en".

45 El término "anticuerpo" se refiere en particular a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural, así como todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados, anticuerpo humanizado, y anticuerpo quimérico. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena pesada comprende tres o - en el caso de los anticuerpos del tipo IgM o IgE - cuatro dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2, CH3 y CH4) en donde el primer dominio constante CH1 es adyacente a la región variable y puede estar conectado al segundo dominio constante CH2 por una región bisagra. La región constante de cadena ligera se compone sólo de un dominio constante. Las regiones variables pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR), en las que cada región variable comprende tres CDR y cuatro FR. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos del huésped o factores, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. El término "anticuerpo", de acuerdo con la invención, sin

embargo, también incluye anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena pesada, es decir anticuerpos solamente compuestos de uno o más, en particular dos cadenas pesadas, y nanocuerpos, es decir, anticuerpos solamente compuestos por un dominio único variable monomérico.

5 En particular, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, tal como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, incluyendo cualquier subclase tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 o IgG2, más preferiblemente un anticuerpo IgG1. Las regiones constantes de cadena pesada pueden ser de cualquier tipo tal como cadenas pesadas del tipo γ , δ , α , μ o ϵ . Además, la región constante de cadena ligera también puede ser de cualquier tipo tal como cadenas ligeras de tipo κ o λ . Preferiblemente, la cadena ligera del anticuerpo es una cadena κ .

10 Para indicar las posiciones de los aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera, se usa el sistema de numeración de Kabat en el presente documento (Kabat, EA y colaboradores (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación de los NIH No. 91-3242). De acuerdo con dicho sistema, la cadena pesada comprende las posiciones de los aminoácidos desde la posición 0 hasta la posición 113 incluyendo la posición 35A, 35B, 52A a 52C, 82A a 82C y 100A a 100K. Las CDR de la región variable de cadena pesada se encuentran, de acuerdo con la numeración de Kabat, en las posiciones 31 a 35B (CDR1), 50 a 65 (CDR2) y 95 a 102 (CDR3). Las demás posiciones de los aminoácidos forman las regiones marco FR1 a FR4. La región variable de cadena ligera comprende las posiciones 0 a 109, incluyendo las posiciones 27A a 27F, 95A a 95F y 106A. Las CDR están situadas en las posiciones 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3). Dependiendo de la formación inicial del gen específico de un anticuerpo, no todas estas posiciones tienen que estar presentes en una región variable dada de cadena pesada o en una región variable dada de cadena ligera. En el caso en que se mencione una posición de un aminoácido en una región variable de cadena pesada o de cadena ligera en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se refiere a la posición de acuerdo con la numeración de Kabat.

15 La "parte Fab" de un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo, en particular, se refiere a una parte del anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) y la primera de las regiones constantes de cadena pesada y ligera (CH1 y CL). En los casos en que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no contienen todas estas regiones, entonces el término "parte Fab" se refiere sólo a aquellas de las regiones VH, VL, CH1 y CL que están presentes en el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, "parte Fab" se refiere a aquella parte de un anticuerpo que corresponde al fragmento obtenido mediante digestión de un anticuerpo natural con papaína que contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En particular, la parte Fab de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo abarca el sitio de unión al antígeno o capacidad de unión al antígeno del mismo. Preferiblemente, la parte Fab comprende al menos la región VH del anticuerpo.

20 La "parte Fc" de un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo, en particular, se refiere a una parte del anticuerpo que comprende las regiones constantes de la cadena pesada 2, 3 y - en su caso - 4 (CH2, CH3 y CH4). En los casos en que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no contengan todas estas regiones, entonces el término "parte Fc" sólo se refiere a aquellas de las regiones CH2, CH3 y CH4 que están presentes en el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, "parte Fc" se refiere a aquella parte de un anticuerpo que corresponde al fragmento obtenido mediante digestión de un anticuerpo natural con papaína que no contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En particular, la parte Fc de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo es capaz de unirse a un receptor de Fc y por lo tanto, por ejemplo, comprende un sitio de unión al receptor de Fc o una capacidad de unión al receptor de Fc. Además, preferiblemente, es capaz de inducir ADCC. Preferiblemente, la parte Fc comprende al menos la región CH2 del anticuerpo.

25 Se puede observar un dibujo esquemático de un anticuerpo de la clase IgG que incluye la parte Fab y la parte Fc en la Figura 21A.

30 De acuerdo con la presente invención, el término "anticuerpo quimérico" se refiere en particular a un anticuerpo en el que las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano o una secuencia de consenso de anticuerpo humano, y en donde al menos uno y preferiblemente ambas regiones variables se derivan de un anticuerpo no humano, en particular de un anticuerpo de ratón.

35 De acuerdo con la presente invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere en particular a un anticuerpo en el que al menos una CDR se deriva de un anticuerpo no humano, y en donde las regiones constantes, si están presentes, y al menos una región marco de una región variable se derivan de un anticuerpo humano o una secuencia de consenso de anticuerpo humano. Preferiblemente, todas las CDR de la región variable de cadena pesada o, más preferiblemente, todas las CDR de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, se derivan del anticuerpo no humano. Además, preferiblemente todas las regiones marco de la región variable de cadena pesada o, más preferiblemente, todas las regiones marco de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, se derivan de un anticuerpo humano o una secuencia de consenso de anticuerpo humano. Las CDR preferiblemente se derivan del mismo anticuerpo no humano. Las tres primeras o la totalidad de las regiones marco de una región variable preferiblemente se derivan del mismo anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano, sin embargo, las regiones marco de la región variable de cadena pesada no tienen que derivarse del mismo anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano que las regiones marco de la región variable de cadena ligera.

En realizaciones particulares preferidas, el anticuerpo humanizado es capaz de unirse a los mismos antígenos, en particular los mismos epítomos que el anticuerpo no humano del que se derivan las una o más CDR.

5 Preferiblemente, las CDR del anticuerpo humanizado que se derivan del anticuerpo no humano son idénticas a las CDR del anticuerpo no humano. Además, las regiones marco del anticuerpo humanizado que se derivan del anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano pueden ser idénticas a las regiones marco del anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano. En otra realización, las regiones marco del anticuerpo humanizado pueden tener uno o más sustituciones de aminoácidos en comparación con las regiones marco del anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano de la que se derivan. Los residuos de aminoácidos sustituidos se reemplazan preferiblemente por los residuos de aminoácidos correspondientes del anticuerpo no humano del que se derivan una o más de las CDR (en particular aquellos residuos de aminoácidos correspondientes que se encuentran en la misma posición de acuerdo con la numeración de Kabat). En particular, las regiones marco de una región variable (región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera) del anticuerpo humanizado comprenden preferiblemente no más de 30 sustituciones de aminoácidos, preferiblemente no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 12, no más de 10 o no más de 8 sustituciones de aminoácidos.

15 En realizaciones preferidas, todas las regiones marco de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado, en conjunto, comparten una homología o una identidad de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 85 % o al menos 90%, con las regiones marco de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano de la que se derivan. Además, todas las regiones marco de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado, en conjunto, comparten preferiblemente una homología o una identidad de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o al menos 90%, con las regiones marco de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano de la que se derivan.

25 Las regiones constantes de un anticuerpo quimérico o humanizado se pueden derivar de cualquier anticuerpo humano o secuencia de consenso de anticuerpo humano. En particular, las regiones constantes de cadena pesada pueden ser de cualquier tipo tal como cadenas pesadas del tipo γ , δ , α , μ o ϵ . El anticuerpo quimérico o humanizado puede por lo tanto ser de cualquier isotipo, tal como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, incluyendo cualquier subclase tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2. Preferiblemente, el anticuerpo quimérico o humanizado es un anticuerpo IgG1 o IgG2, más preferiblemente un anticuerpo IgG1. Además, la región constante de cadena ligera también puede ser de cualquier tipo tal como cadenas ligeras del tipo κ o λ . Preferiblemente, la cadena ligera de un anticuerpo quimérico o humanizado es una cadena κ .

35 Una secuencia de aminoácidos objetivo se "deriva" de una secuencia de aminoácidos de referencia si la secuencia de aminoácidos objetivo comparte una homología o identidad en toda su longitud con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95% o al menos 97%. Por ejemplo, si una región marco de un anticuerpo humanizado se deriva de una región variable de un anticuerpo humano en particular, entonces el aminoácido de la región marco del anticuerpo humanizado comparte una homología o identidad en toda su longitud con la correspondiente región marco del anticuerpo humano de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95% o al menos 97%. La "parte correspondiente" o "región marco correspondiente" significa que, por ejemplo, la región marco 1 de una región variable de cadena pesada (FRH1) de un anticuerpo objetivo corresponde a la región marco 1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia. Lo mismo es cierto, por ejemplo, para FRH2, FRH3, FRH4, FRL1, FRL2, FRL3 y FRL4. En realizaciones particulares, una secuencia de aminoácidos objetivo que se "deriva" de una secuencia de aminoácidos de referencia es 100% homóloga, o en particular 100% idéntica, en toda su longitud con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia.

45 Un "fragmento o derivado" de un anticuerpo en particular, es una proteína o glicoproteína que se deriva de dicho anticuerpo y es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, al mismo epítomo que el anticuerpo. Por lo tanto, un fragmento o derivado de un anticuerpo se refiere aquí en general a un fragmento funcional o derivado. Un fragmento funcional o derivado de un anticuerpo en particular, es capaz de unirse al mismo antígeno, especialmente el mismo epítomo que el anticuerpo. En formas de realización particularmente preferidas, el fragmento o derivado de un anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o sus derivados. Ejemplos de fragmentos o derivados de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadena pesada y cadena ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera

covalentemente unidas entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir en forma intermolecular pero no intramolecular. Estos fragmentos de anticuerpo y derivados se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

5 "Unión específica" significa preferiblemente que un agente tal como un anticuerpo se une más fuerte a un objetivo tal como un epítipo para el que es específico en comparación con la unión con otro objetivo. Un agente se une más fuertemente a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_d) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferiblemente, la constante de disociación para el objetivo al cual se une el agente específicamente es más de 2 veces, preferiblemente más de 5 veces, más preferiblemente más de 10 veces, incluso más preferiblemente más de 20 veces, 10 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1.000 veces menor que la constante de disociación para el objetivo al cual el agente no se une específicamente.

15 El término "ácido siálico", en particular se refiere a cualquiera de los derivados de ácido neuramínico sustituidos en N o en O. Se refiere preferiblemente tanto al ácido 5-N-acetilneuramínico como al ácido 5-N-glicolilneuramínico, más preferiblemente sólo a ácido 5-N-acetilneuramínico. El ácido siálico, en particular el ácido 5-N-acetilneuramínico se une preferiblemente a una cadena de hidratos de carbono de una glicoproteína a través de un enlace 2,6 o 2,3. Preferiblemente, en las composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento, están presentes tanto ácidos siálicos enlazados tanto en 2,3 como en 2,6.

20 El término "unidad de galactosa libre" a que se hace referencia en el presente documento, se refiere en particular a una unidad de galactosa que está unida a través de su extremo reductor a una estructura de hidrato de carbono y que no porta un ácido siálico en su posición 6. En particular, la unidad de galactosa libre no porta ninguna unidad de sacárido en su posición 6. En ciertas realizaciones, la unidad de galactosa libre no porta ninguna modificación química o sustituyente en su posición 6. En particular, la unidad de galactosa no porta un ácido siálico, preferiblemente ningún sacárido y más preferiblemente ninguna modificación química o sustituyente en cualquiera de sus posiciones 2, 3, 4, 5 y 6. En este sentido, los residuos de hidrógeno e hidroxilo de las unidades de galactosa no se consideran como modificaciones químicas o sustituyentes.

25 El término "sitio de glicosilación" se refiere en particular, a cualquier secuencia de aminoácidos que puede ser reconocida por una enzima capaz de catalizar la unión de una unidad de monosacárido o una cadena de hidratos de carbono a una cadena peptídica. Preferiblemente, el sitio de glicosilación incluye el residuo de aminoácido al que está unido la unidad de monosacárido o una cadena de hidratos de carbono. Los sitios de glicosilación preferidos son los sitios de N-glicosilación, en particular sitios de N-glicosilación que comprenden un residuo de asparagina como sitio de unión, y los sitios de O-glicosilación, en particular sitios de O-glicosilación que comprenden un residuo de serina o treonina como sitio de unión. Un sitio de N-glicosilación preferido comprende la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido preferiblemente excepto Pro. Esta secuencia de aminoácidos se refiere a una secuencia de tres aminoácidos consecutivos, en donde el primer residuo de aminoácido es un residuo de asparagina, el segundo residuo de aminoácido puede ser cualquier residuo de aminoácido, en particular, cualquier residuo de aminoácido de origen natural, excepto prolina, y el tercer residuo de aminoácido es una serina o treonina. Cuando está glicosilada, la cadena de hidrato de carbono se une al residuo de asparagina.

30 Los números dados en el presente documento, en particular las cantidades relativas de una propiedad de glicosilación específica, deben entenderse preferiblemente como números aproximados. En particular, los números pueden ser preferiblemente hasta 10% superiores y/o inferiores, en particular hasta 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% superiores y/o inferiores.

35 El término "ácido nucleico" incluye ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos, así como ácidos desoxirribonucleicos monocatenarios y bicatenarios. Puede comprender nucleótidos de origen natural, así como sintéticos y pueden ser naturales o modificados sintéticamente, por ejemplo por metilación, protegidos en 5' y/o 3'.

40 De acuerdo con la invención, el término "célula huésped" se refiere a cualquier célula que puede ser transformada o transfectada con un ácido nucleico exógeno. El término "células huésped" comprende de acuerdo con la invención células procariotas (por ejemplo *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, en particular células humanas, células de levadura y células de insectos). Se da preferencia particular a las células de mamífero tales como células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras, o primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y líneas celulares. Preferiblemente, la célula huésped es una célula humana, en particular una célula humana inmortalizada, preferiblemente una célula de sangre humana inmortalizada tal como una célula mieloide humana inmortalizada o una célula de leucemia mieloide humana inmortalizada. Además, la célula huésped también puede ser una célula tumoral humana inmortalizada. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en forma de una sola copia o de dos o más copias y, en una 45 50 55 realización, se expresa en la célula huésped.

El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en

particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como una ratón y una rata. En una realización particularmente preferida, el paciente es un ser humano.

5 El término "cáncer", de acuerdo con la invención, en particular comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de nódulos linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y las metástasis de los mismos. Ejemplos de los mismos son carcinomas de pulmón, carcinomas colorrectales, carcinomas de cabeza y cuello, o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de 10 acuerdo con la invención comprende también las metástasis del cáncer.

15 Por "tumor" se entiende un grupo de células o tejido que se forma por una proliferación celular desregulada, en particular cáncer. Los tumores pueden mostrar una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y usualmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna o maligna. En particular, el término "tumor" se refiere a un tumor maligno. De acuerdo con una realización, el término "tumor" o "célula tumoral" también se refiere a los cánceres no sólidos y a células de cánceres no sólidos tales como células de leucemia. Según otra realización, los cánceres no sólidos o las células respectivas de los mismos no están abarcados por los términos "tumor" y "célula tumoral".

20 Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas de su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y normalmente implica el desprendimiento de las células cancerosas de un tumor primario, que entran en la circulación del cuerpo y se asientan para empezar a crecer dentro de los tejidos normales en otras partes del cuerpo. Cuando las células tumorales hacen metástasis, el nuevo tumor se denomina un tumor secundario o metastásico, y sus células normalmente se parecen a las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si el cáncer de mama hace metástasis a los pulmones, el tumor secundario se compone de células de mama anormales, no de células pulmonares anormales. El tumor en el pulmón se llama entonces cáncer de 25 mama metastásico, no cáncer de pulmón.

30 El término "composición farmacéutica" se refiere particularmente a una composición adecuada para la administración a un humano o animal, es decir, una composición que contiene componentes que son farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, una composición farmacéutica que comprende un compuesto activo o una sal o profármaco del mismo junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico tal como un regulador, conservante y modificador de la tonicidad.

35 El término "composición del anticuerpo", en particular se refiere a cualquier composición que comprende un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo. La composición del anticuerpo puede ser una composición fluida o sólida, y también incluye composiciones del anticuerpo liofilizadas o reconstituidas. Preferiblemente se utiliza una composición fluida, más preferiblemente una composición acuosa. Comprende preferiblemente además un disolvente tal como agua, un regulador para ajustar el valor del pH, y opcionalmente otros agentes para estabilizar el anticuerpo o prevenir la degradación del anticuerpo. La composición del anticuerpo comprende preferiblemente, una cantidad razonable de anticuerpos, en particular al menos 1 fmol, preferiblemente al menos 1 pmol, al menos 1 nmol o al menos 1 mol del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Sin embargo, en ciertas realizaciones también se incluyen composiciones 40 del anticuerpo que comprenden sólo una molécula de anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento o derivado específico del mismo puede comprender adicionalmente otros anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos. Sin embargo, preferiblemente una composición que comprende un anticuerpo específico o fragmento o derivado del mismo no comprende otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o derivados aparte del anticuerpo específico o fragmento o derivado del mismo. En particular, al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, más preferiblemente de aproximadamente 100% de los anticuerpos en una composición del anticuerpo 45 están dirigidos a o se unen al mismo antígeno o epitopo.

50 La "cantidad promedio de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono", de acuerdo con la invención en particular, se refiere al número de residuos de ácido siálico que están presentes en promedio en una cadena de hidratos de carbono de un grupo de cadenas de hidratos de carbono. En particular, se refiere al número total de residuos de ácido siálico unidos a los hidratos de carbono de un grupo de cadenas de hidratos de carbono dividido por el número total de cadenas de hidratos de carbono en dicho grupo. Una cantidad promedio de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono de 1,0 significa que en un grupo de cadenas de hidratos de carbono, cada cadena de hidratos de carbono en promedio comprende 1,0 residuo de ácido siálico. El término "cadena de hidrato de carbono" en este 55 sentido se refiere preferiblemente a la cadena de hidrato de carbono unida a una cadena polipeptídica de un anticuerpo. El grupo de la cadena de hidratos de carbono se refiere preferiblemente a todas las cadenas de hidratos de carbono de todos los anticuerpos presentes en una composición del anticuerpo, o a todas las cadenas de hidratos de carbono de todos los anticuerpos de un tipo específico en una composición del anticuerpo, o a todas las cadenas de hidratos de carbono presentes en una parte específica o en un sitio de glicosilación específico de todos los anticuerpos (de un tipo

específico) en una composición del anticuerpo.

El término "vida media en circulación" se refiere preferiblemente al tiempo que transcurre después de la administración de un agente a la circulación de un cuerpo vivo, en particular, el cuerpo humano, hasta que sólo la mitad de la cantidad administrada del agente está presente en la circulación. En el caso de agentes terapéuticamente activos, se desea una mayor vida media en circulación en general ya que entonces el agente tiene un efecto terapéutico más duradero. La "velocidad de eliminación" se refiere preferiblemente a la velocidad a la cual se elimina un agente de la circulación de un cuerpo vivo, en particular el cuerpo humano. A mayor velocidad de eliminación resulta normalmente por lo tanto en una menor vida media en circulación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en los hallazgos de que - en contraste con las enseñanzas de la técnica anterior - la cantidad de residuos de ácido siálico en las cadenas de hidratos de carbono unida a la parte Fab de un anticuerpo que tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab es decisiva para la vida media en circulación y, por tanto, la biodisponibilidad de dicho anticuerpo. En particular, un alto grado de sialilación de la parte Fab trae como resultado una alta vida media del anticuerpo en la circulación del paciente. Del mismo modo, un menor grado de sialilación de la parte Fab conduce a una menor vida media en circulación. Sin embargo, también se encontró que al retirar el sitio de glicosilación en la parte Fab de un anticuerpo y por lo tanto eliminando cualquier glicosilación de Fab, la vida media en circulación del anticuerpo es comparable a la de un anticuerpo que tiene un grado entre moderado y alto de sialilación de la parte Fab. Por lo tanto, la vida media en circulación de un anticuerpo pobremente sialilado no sólo puede aumentarse mediante el aumento de la cantidad de ácido siálico, sino también que también puede aumentarse mediante la eliminación del sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo si está presente un sitio de glicosilación respectivo. Además, los presentes inventores sorprendentemente han encontrado que el ajuste del contenido de ácido siálico en la glicosilación de la parte Fab a menudo no afecta la unión del antígeno o la especificidad del antígeno del anticuerpo y, además, a menudo tampoco tiene ningún efecto negativo sobre las actividades biológicas secuencia abajo de anticuerpo, tales como su actividad de ADCC y CDC. En los casos en que un cambio en el contenido de ácido siálico tiene una influencia negativa sobre la unión del antígeno, también se puede remover el sitio de glicosilación en la parte Fab para aumentar la vida media en circulación y/o se puede introducir un sitio adicional de glicosilación en otra posición en la parte Fab y se puede ajustar por lo tanto el contenido de ácido siálico de esta glicosilación de Fab recientemente introducida como se enseña en el presente documento. Una ventaja adicional encontrada por los presentes inventores es la posibilidad de aumentar la sialilación de Fab al mismo tiempo que se mantiene en un mínimo la sialilación en la parte Fc. De este modo, tampoco se afectan las actividades ADCC y CDC de los anticuerpos por el aumento de la sialilación de la parte Fab.

Método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo

En vista de estos hallazgos, la presente invención proporciona un método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo en una composición del anticuerpo, que comprende ajustar en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo, la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos. De este modo, también es posible generar vidas medias en circulación que son hechas a la medida con respecto al uso pretendido del anticuerpo. Esto proporciona la flexibilidad para ajustar la vida media en circulación de anticuerpos sin la necesidad de utilizar modificaciones químicas (tales como PEG o HES) o proteínas de fusión.

En particular, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende la etapa de

(a) para aumentar la vida media en circulación

(a1) aumentar en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; y/o

(a2) disminuir en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; o

(b) para disminuir la vida media en circulación

(b1) disminuir en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; y/o

(b2) aumentar en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos;

5 en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada cadena pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidos entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.

15 Por lo tanto, cuando se utiliza el método de acuerdo con la presente invención, es posible controlar individualmente la vida media en circulación de un anticuerpo dado, ajustando el grado de sialilación y/o el grado de unidades de galactosa libres ya presentes o sitios de glicosilación artificialmente introducidos en la parte Fab del anticuerpo.

20 Los ácidos siálicos en las cadenas de hidratos de carbono de los anticuerpos están unidos a unidades de galactosa en el(los) extremo(s) no reductor(es) de la estructura de hidrato de carbono. Por lo tanto, un aumento en la cantidad de ácidos siálicos también se traduce en una disminución de la cantidad de unidades de galactosa libres y viceversa. El aumento y la disminución de la cantidad de unidades de galactosa libres puede conseguirse, por ejemplo, disminuyendo o aumentando la cantidad de ácido siálico, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de unidades de galactosa libres también puede ser reducida por unión de otros residuos a las unidades de galactosa libres, por ejemplo residuos de acetilo, ácidos glucurónicos o sulfatos, y/o mediante la eliminación de unidades de galactosa libres de los hidratos de carbono. Del mismo modo, el aumento de la cantidad de unidades de galactosa libres puede lograrse por la disminución de la cantidad de ácidos siálicos y/o la unión de más unidades de galactosa a los hidratos de carbono que no están totalmente galactosilados.

Aumento de la vida media en circulación

30 Para aumentar la vida media en circulación de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención, se pueden aumentar la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprendidos en la composición.

35 En realizaciones preferidas, la cantidad de ácidos siálicos se aumenta de modo que en la composición al menos 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenda al menos un residuo de ácido siálico. Preferiblemente, en la composición al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, al menos 68%, al menos 70% o más preferiblemente al menos 75% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab comprenden al menos un residuo de ácido siálico. En ciertas realizaciones, la cantidad de ácidos siálicos se aumenta de modo que en la composición al menos 20% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprende al menos dos residuos de ácido siálico. Preferiblemente, en la composición al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o más preferiblemente al menos 45% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab comprenden al menos dos residuos de ácido siálico.

45 Preferiblemente, la cantidad de ácidos siálicos se aumenta de modo que en la composición la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprenden al menos un residuo de ácido siálico aumenta en al menos 5 puntos porcentuales, más preferiblemente en al menos 7 puntos porcentuales, al menos 10 puntos porcentuales, al menos 15 puntos porcentuales, al menos 20 puntos porcentuales, al menos 25 puntos porcentuales, al menos 30 puntos porcentuales, al menos 35 puntos porcentuales, al menos 40 puntos porcentuales, al menos 45 puntos porcentuales, o al menos 50 puntos porcentuales. La cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos un residuo de ácido siálico en la composición es el porcentaje de hidratos de carbono que comprende al menos un residuo de ácido siálico de todos los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la composición. Un aumento de 10 puntos porcentuales, por ejemplo, se refiere a una realización en la que se incrementa el valor del porcentaje de la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprenden al menos un residuo de ácido siálico en la composición, por 10 en la etapa (a1), es decir, antes de la etapa (a1), la cantidad relativa es X% y después de la etapa (a1), la cantidad relativa es (X + 10)%.

5 En la composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo, la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se incrementa en al menos 5 puntos porcentuales. Preferiblemente, en la composición al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, al menos 68%, al menos 70% o más preferiblemente al menos 75% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab comprenden al menos un residuo de ácido siálico.

10 Un incremento en la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab también incluye el aumento del número de ácidos siálicos en hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que ya contiene al menos un residuo de ácido siálico. En particular, el aumento en la cantidad de ácidos siálicos de acuerdo con la etapa (a1) del método de acuerdo con la presente invención se refiere preferiblemente a un aumento en la cantidad media de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición. Preferiblemente, dicha cantidad promedio de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono se aumenta en al menos 0,01, más preferiblemente en al menos 0,05, al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,3 o más preferiblemente en al menos 0,5. En realizaciones preferidas, se aumenta la cantidad de ácidos siálicos de modo que la cantidad media de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición es al menos 0,5, preferiblemente al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,05, o al menos 1,1.

20 Los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab pueden haber estado presentes en el anticuerpo antes de la etapa de incrementar su vida media en circulación o uno o más de estos sitios de glicosilación puede haber sido introducidos en la parte Fab del anticuerpo como parte del método de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la etapa de aumentar la cantidad de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo puede en ciertas realizaciones incluir la etapa de introducir uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab. Estos sitios de glicosilación recientemente introducidos, cuando están glicosilados, portan preferiblemente hidratos de carbono en donde al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 65%, al menos 68%, al menos 70% o más preferiblemente al menos 75% de dichos hidratos de carbono en la composición comprenden al menos un residuo de ácido siálico. La introducción de un sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se describe en forma más detallada a continuación.

25 En ciertas realizaciones, la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab se aumenta sin aumentar significativamente la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.

30 Preferiblemente, la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en la composición es de menos del 20%, más preferiblemente menos del 15%, menos del 10%, menos del 8% o más preferiblemente menos del 7% después de realizar el método de acuerdo con la presente invención. En particular, menos del 20%, preferiblemente menos del 15%, menos del 10% o menos del 8%, lo más preferiblemente menos del 7% de los hidratos de carbono unidos a los sitios de glicosilación en la parte Fc de los anticuerpos comprenden uno o más siálico ácidos.

35 En ciertas realizaciones, la cantidad de unidades de galactosa libres se disminuye, de manera que en la composición menos del 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos dos unidades de galactosa libres. Preferiblemente, en la composición menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 7% o menos del 5% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación presentes en la parte Fab comprenden dos o más unidades de galactosa libres. Además, en la composición, preferiblemente menos del 95% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos una unidad de galactosa libre. Más preferiblemente, en la composición menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55%, menos del 50%, menos del 45% o menos del 40% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación presentes en la parte Fab comprenden una o más unidades de galactosa libres.

40 Preferiblemente, se reduce la cantidad de unidades de galactosa libres para que en la composición la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, disminuye en al menos 5 puntos porcentuales, más preferiblemente en al menos 7 puntos porcentuales, al menos 10 puntos porcentuales, al menos 15 puntos porcentuales, al menos 20 puntos porcentuales, al menos 25 puntos porcentuales, al menos 30 puntos porcentuales, al menos 35 puntos porcentuales, al menos 40 puntos porcentuales, al menos 45 puntos porcentuales, o al menos 50 puntos porcentuales. La cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, en la composición es el porcentaje de hidratos de carbono que comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, de todos los hidratos

de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la composición. Una disminución de 10 puntos porcentuales, por ejemplo, se refiere a una forma de realización en la que el valor en porcentaje de la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, en la composición se reduce por 10 en la etapa (a2), es decir, antes de la etapa (a2), la cantidad relativa es X% y después de la etapa (a2), la cantidad relativa es $(X - 10)\%$.

Una disminución en la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab también incluye la reducción del número de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en el parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que comprende más de una unidad de galactosa libre. En particular, la disminución de la cantidad de unidades de galactosa libres de acuerdo con la etapa (a2) del método de acuerdo con la presente invención se refiere preferiblemente a una disminución en la cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición. Preferiblemente, dicha cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono se reduce en al menos 0,01, más preferiblemente en al menos 0,05, al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,3 o más preferiblemente en al menos 0,5. En realizaciones preferidas, se reduce la cantidad de unidades de galactosa libres para que la cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en el composición sea de menos de 1,5, preferiblemente menos de 1,4, menos de 1,3, menos de 1,2, menos de 1,1, menos de 1,0, preferiblemente menos de 0,9, menos de 0,8, menos de 0,7, menos de 0,6 o menos de 0,5. Preferiblemente, una disminución en la cantidad de unidades de galactosa libres se logra mediante el aumento de la cantidad de ácidos siálicos.

El aumento de la cantidad de ácidos siálicos y/o la disminución de la cantidad de unidades de galactosa libres se puede lograr por cualquier medio conocido, incluyendo expresar el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en una célula o línea celular que tiene una alta actividad de sialilación. Las líneas celulares que tienen un alto grado de sialilación se pueden obtener, por ejemplo, mediante la selección de clones individuales adecuados de una línea celular o mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular. Las líneas celulares que tienen una alta actividad de sialilación se pueden obtener, en particular, mediante pruebas de detección de mutagénesis de líneas celulares adecuadas para la expresión de anticuerpos, en donde se seleccionan los clones de células que tienen una alta actividad de sialilación. Además, la expresión de enzima(s) responsable(s) de la sialilación de glicoproteínas puede ser inducida o mejorada en la célula o en la línea celular, por ejemplo mediante la inducción o el aumento de la expresión de la enzima(s) endógena(s) y/o mediante la introducción de casete(s) de expresión exógena para dicha enzima(s). Las enzimas adecuadas son, por ejemplo, sialiltransferasas que son responsables de la transferencia del residuo de ácido siálico a una cadena de hidratos de carbono, transportador que controla el transporte del residuo de ácido siálico o de sus precursores a la sección relevante u orgánulo en la célula, o enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos siálicos. Los ejemplos particulares son sialiltransferasas tales como $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ -sialiltransferasas, transportadores tales como el transportador de ácido CMP-siálico, epimerasas tales como UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa, quinasas tales como la N-acetilmanosamina quinasa y N-acetilglucosamina quinasa, ácido N-acetilneuramínico-9-P-sintetasa, ácido N-acetilneuramínico-9-P-fosfatasa y ácido CMP-N-acetilneuramínico sintetasa. Además, se pueden utilizar condiciones de cultivo durante la expresión que dan lugar a un alto grado de sialilación. Los métodos adecuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2005/080585. Alternativa o adicionalmente, se puede utilizar sialilación *in vitro*, en particular, sialilación enzimática usando una sialiltransferasa y un sustrato adecuado, o sialilación química utilizando reactivos químicos adecuados. Un ejemplo de una línea celular que es capaz de proporcionar un alto grado de sialilación es GT-5s, depositada el 28 de julio de 2010 bajo el número de acceso DSM ACC 3078 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (Alemania) por el Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania), o una línea celular derivada de la misma o una línea celular homóloga a la misma. GT-5s es una línea celular derivada de células K562 y ha sido seleccionada por su alta actividad de sialilación. K562 es una línea celular de leucemia mieloide humana presente en la American Type Culture Collection (ATCC CCL-243). GT-5s y líneas celulares derivadas de la misma pueden ser cultivadas y mantenidas bajo las condiciones adecuadas conocidas para K562.

Una línea celular que se deriva de GT-5s puede ser obtenida por ejemplo mediante selección al azar o específica de un único clon o un grupo de células de un cultivo de GT-5s, opcionalmente después del tratamiento de las células GT-5s con el fin de mejorar su tasa de mutación, o alterando genéticamente una línea celular GT-5s. El clon seleccionado o grupo de células pueden ser tratadas además como se describió anteriormente y/o se pueden llevar a cabo nuevas rondas de selección. Una línea celular que es homóloga a GT-5s, en particular, es una línea celular mieloide humana inmortalizada. Preferiblemente, una línea celular derivada de u homóloga a GT-5s es capaz de proporcionar anticuerpos que tienen un patrón de glicosilación similar al obtenido a partir de GT-5s. Preferiblemente, los anticuerpos que son producidos por una línea celular derivada de u homóloga a GT-5s tiene una o más de las características de glicosilación como se describe en el presente documento, en particular un alto grado de sialilación, preferiblemente un alto grado de sialilación en la parte Fab. En una realización preferida, la línea celular derivada de u homóloga a GT-5s además es capaz de producir anticuerpos que tienen un bajo grado de fucosilación como se describe en el presente documento, en

- particular un bajo grado de fucosilación en su parte Fc. El patrón de glicosilación similar de anticuerpos que son producidos por la línea celular derivada de u homóloga a GT-5s difiere preferiblemente del patrón de glicosilación de los anticuerpos obtenidos a partir de GT-5s en un 20% o menos, más preferiblemente 15% o menos, 10% o menos o 5% o menos, en particular en uno o más, preferiblemente todas las propiedades de glicosilación seleccionadas del grupo que consiste en la cantidad en porcentaje de hidratos de carbono que portan bisGlcNAc, la cantidad en porcentaje de hidratos de carbono sialilados, la cantidad en porcentaje de hidratos de carbono que portan un residuo de galactosa libre, la cantidad porcentual de ácidos siálicos acoplados en 2,6 y la cantidad en porcentaje de hidratos de carbono que portan fucosa. En realizaciones particularmente preferidas, las propiedades de glicosilación similares no abarcan la cantidad en porcentaje de hidratos de carbono que portan fucosa.
- 5
- 10 La línea celular GT-5s, así como las líneas celulares derivadas de la misma y las líneas celulares homóloga de la misma son ventajosas en particular ya que proporcionan una producción de proteínas muy estable y homogénea, en particular con respecto a los anticuerpos. Tienen una muy buena consistencia de lote a lote, es decir, las proteínas producidas y su patrón de glicosilación son similares cuando se obtienen de diferentes series de producción o cuando se producen a diferentes escalas y/o con diferentes procedimientos de cultivo.
- 15 La vida media en circulación de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo también puede ser aumentada mediante la eliminación de uno o más sitios de glicosilación que están presentes en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Mediante la remoción de dicho(s) sitio(s) de glicosilación, se evita la presencia de hidratos de carbono en la parte Fab de los anticuerpos o fragmento o derivado del mismo que tienen un bajo grado de sialilación y/o un alto grado de unidades de galactosa libres. Ya que estos hidratos de carbono pobremente sialilados son responsables de una rápida tasa de eliminación de los anticuerpos de la circulación del paciente, la eliminación de el(los) sitio(s) de glicosilación respectivo(s) en la parte Fab del anticuerpo aumenta su vida media en circulación.
- 20
- La eliminación de un sitio de glicosilación puede hacerse mediante modificación por ingeniería genética del ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. En particular, se elimina el sitio de glicosilación mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, se mutan uno o más de los codones que codifican para los aminoácidos del sitio de glicosilación de modo que se consigue la sustitución, adición o supresión de al menos un amino ácido, en el sitio de glicosilación. En particular, se suprime o se sustituye el aminoácido al cual está unido la cadena de hidrato de carbono, preferiblemente por un aminoácido que no puede funcionar como un aceptor de hidratos de carbono. Alternativa o adicionalmente, también se puede sustituir o suprimir otro aminoácido del sitio de glicosilación, o se pueden añadir uno o más aminoácidos adicionales en el sitio de glicosilación, de modo que la secuencia de aminoácidos alterada no funciona como sitio de reconocimiento para la glicosilación enzimática.
- 25
- 30 El anticuerpo o fragmento o derivado del mismo del cual se remueven uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab puede tener cualquier número de sitios de glicosilación en la parte Fab, por ejemplo, sólo un sitio de glicosilación, al menos dos sitios de glicosilación o al menos tres sitios de glicosilación en la parte Fab. No todos los sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tienen que ser removidos. Sin embargo, preferiblemente se remueven todos los sitios de glicosilación presentes en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo para obtener el máximo incremento de vida media en circulación.
- 35
- Disminución de la vida media en circulación
- 40 Para la disminución de la vida media en circulación de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención, se puede disminuir la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo presente en la composición.
- En realizaciones preferidas, se disminuye la cantidad de ácidos siálicos de modo que en la composición menos del 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos un residuo de ácido siálico. Preferiblemente, en la composición menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 7%, menos del 5%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación presentes en la parte Fab comprenden uno o más residuos de ácido siálico. De acuerdo con una de las realizaciones, se reduce la cantidad de ácidos siálicos de modo que en la composición aproximadamente 0% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos un residuo de ácido siálico. En ciertas realizaciones, se reduce la cantidad de ácidos siálicos de modo que en la composición menos del 30% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos dos residuos de ácido siálico. Preferiblemente, en la composición menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 7%, menos del 5%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1%, más preferiblemente aproximadamente 0% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación presentes en la parte Fab comprenden dos o más residuos de ácido siálico.
- 45
- 50
- 55 Preferiblemente, se reduce la cantidad de ácidos siálicos de modo que en la composición la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos un residuo de

5 ácido siálico en al menos 5 puntos porcentuales, más preferiblemente en al menos 7 puntos porcentuales, al menos 10 puntos porcentuales, al menos 15 puntos porcentuales, al menos 20 puntos porcentuales, al menos 25 puntos porcentuales, al menos 30 puntos porcentuales, al menos 35 puntos porcentuales, al menos 40 puntos porcentuales, al menos 45 puntos porcentuales, o al menos 50 puntos porcentuales. La cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos un residuo de ácido siálico en la composición, es el porcentaje de hidratos de carbono que comprende al menos un residuo de ácido siálico de todos los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la composición. Una disminución de 10 puntos porcentuales, por ejemplo, se refiere a una forma de realización en la que se reduce el valor porcentual de la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprenden al menos un residuo de ácido siálico en la composición por 10 en la etapa (b1), es decir, antes de la etapa (b1), la cantidad relativa es X% y después de la etapa (b1), la cantidad relativa es $(X - 10)\%$.

15 Una disminución en la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab también incluye la reducción del número de ácidos siálicos en hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que comprende más de un residuo de ácido siálico. En particular, la disminución de la cantidad de ácidos siálicos de acuerdo con la etapa (b1) del método de acuerdo con la presente invención se refiere preferiblemente a una disminución en la cantidad media de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición. Preferiblemente, dicha cantidad promedio de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono se reduce en al menos 0,01, más preferiblemente en al menos 0,05, al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,3 o más preferiblemente en al menos 0,5. En realizaciones preferidas, se reduce la cantidad de ácidos siálicos de modo que la cantidad media de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición es menor a 0,8, preferiblemente menor a 0,7, menor a 0,6, menor a 0,5, menor a 0,4, menor a 0,3, menor a 0,2, menor a 0,1 o menor a 0,05.

20 En ciertas realizaciones, se incrementa la cantidad de unidades de galactosa libres de modo que en la composición al menos 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres. Preferiblemente, en la composición al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres.

30 Preferiblemente, se incrementa la cantidad de unidades de galactosa libres de modo que en la composición la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, en al menos 5 puntos porcentuales, más preferiblemente al menos 7 puntos porcentuales, al menos 10 puntos porcentuales, al menos 15 puntos porcentuales, al menos 20 puntos porcentuales, al menos 25 puntos porcentuales, al menos 30 puntos porcentuales, al menos 35 puntos porcentuales, al menos 40 puntos porcentuales, al menos 45 puntos porcentuales, o al menos 50 puntos porcentuales. La cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprende al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, de todos los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la composición. Un aumento de 10 puntos porcentuales, por ejemplo, se refiere a una forma de realización en la que se incrementa el valor porcentual de la cantidad relativa de hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab que comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres, en la composición por 10 en la etapa (b2), es decir, antes de la etapa (b2), la cantidad relativa es X% y después de la etapa (b2), la cantidad relativa es $(X + 10)\%$.

40 Un incremento en la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab también incluye el aumento del número de unidades de galactosa libres en hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en el parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que ya comprende al menos una unidad de galactosa libre. En particular, el aumento de la cantidad de unidades de galactosa libres de acuerdo con la etapa (b2) del método de acuerdo con la presente invención preferiblemente se refiere a un aumento en la cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición. Preferiblemente, se aumenta dicha cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en al menos 0,01, más preferiblemente en al menos 0,05, al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,3 o más preferiblemente en al menos 0,5. En realizaciones preferidas, se incrementa la cantidad de unidades de galactosa libres de modo que la cantidad media de unidades de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos

en el composición es al menos 0,5, preferiblemente al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9 o al menos 1,95.

5 Los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab pueden haber estado presentes en el anticuerpo antes de la etapa de incrementar su vida media en circulación o uno o más de estos sitios de glicosilación pueden haber sido introducidos en la parte Fab del anticuerpo como parte del método de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la etapa de aumentar la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo puede en ciertas realizaciones incluir la etapa de introducir uno o más sitios de glicosilación en el parte Fab. Estos sitios de glicosilación recientemente introducidos, cuando están glicosilados, portan preferiblemente hidratos de carbono en donde al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de dichos hidratos de carbono en la composición comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres. La introducción de un sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se describe en forma más detallada a continuación.

20 La disminución de la cantidad de ácidos siálicos y/o el aumento de la cantidad de unidades de galactosa libres se puede lograr por cualquier medio conocido, incluyendo expresar el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en una célula o línea celular que tiene baja o nula actividad de sialilación. Las líneas celulares que tienen un bajo o ningún grado de sialilación se pueden obtener, por ejemplo, mediante la selección de clones individuales adecuados de una línea celular, mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular, por ejemplo, la introducción de una o más mutaciones en el genoma de la línea celular, o por desactivación o bloqueo de o interferencia de ARN contra uno o más genes implicados en dicha ruta de sialilación de una línea celular. Los genes adecuados que intervienen en la ruta de sialilación por ejemplo que codifican para sialiltransferasas que son responsables de la transferencia del residuo de ácido siálico a una cadena de hidratos de carbono, transportador que controla el transporte del residuo de ácido siálico o de sus precursores a la sección relevante u orgánulo en la célula, o enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos siálicos. Los ejemplos particulares son sialiltransferasas tales como α 2,6 y α 2,3-sialiltransferasas, transportadores tales como el transportador de ácido CMP-siálico, epimerasas tales como UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa, quinasas tales como la N-acetilmanosamina quinasa y N-acetilglucosamina quinasa, ácido N-acetilneuramínico-9-P-sintetasa, ácido N-acetilneuramínico-9-P-fosfatasa y ácido CMP-N-acetilneuramínico sintetasa. Además, se pueden utilizar condiciones de cultivo durante la expresión que dan lugar a un grado bajo de sialilación. Alternativa o adicionalmente, se puede utilizar des-sialilación *in vitro*, en particular des-sialilación enzimática utilizando un sialilasa, o des-sialilación química utilizando reactivos químicos adecuados. Las líneas celulares adecuadas y métodos para proporcionar glicoproteínas que tienen un contenido específicamente ajustado de ácido siálico, en particular un bajo contenido de ácidos siálicos, se describen, por ejemplo, en el documento WO 2005/080585.

35 La vida media en circulación de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo puede también ser reducida por la introducción de uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Mediante la introducción de dicho(s) sitio(s) de glicosilación, se puede aumentar la presencia de hidratos de carbono que tienen un bajo grado de sialilación en los anticuerpos o fragmento o derivado de los mismos. Estos sitios de glicosilación recientemente introducidos, cuando son glicosilados, portan preferiblemente hidratos de carbono, en donde menos del 50%, más preferiblemente menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 7% o más preferiblemente menos del 5% de dicho hidratos de carbono en la composición comprenden uno o más residuos de ácido siálico. Asimismo, estos sitios de glicosilación recientemente introducidos, cuando son glicosilados, portan preferiblemente hidratos de carbono en donde al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de dichos hidratos de carbono en la composición comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres. Más arriba se describe cómo se puede lograr una baja cantidad respectiva de sialilación.

50 Preferiblemente, se introducen al menos uno, más preferiblemente al menos dos o al menos tres sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. En ciertas realizaciones, se introducen uno, dos o tres sitios de glicosilación. El(Los) sitio(s) de glicosilación se puede introducir por cualquier medio conocido en la técnica. La introducción de un sitio de glicosilación se realiza preferiblemente mediante modificación por ingeniería genética del ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. En particular, se introduce el sitio de glicosilación mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, se mutan uno o más de los codones del anticuerpo de modo que los aminoácidos codificados forman un sitio de glicosilación. La introducción del sitio de glicosilación se puede lograr mediante la adición de uno o más de otros codones, dando como resultado uno o más aminoácidos adicionales, por sustitución de uno o más nucleótidos, dando como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, y/o por la eliminación de uno o más codones, dando como resultado la supresión de uno o más aminoácidos. En particular, se introduce(n) el(los) sitio(s) de glicosilación en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, preferiblemente en la región variable de cadena pesada. Más preferiblemente, se introduce el sitio de glicosilación en las regiones marco de una región variable. Sin embargo, también se puede introducir el sitio de

glicosilación en las regiones constantes de la parte Fab, en particular, la cadena pesada de la región constante 1.

5 Cuando se introducen uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo preferiblemente no contiene originalmente sitios de glicosilación en su parte Fab. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo ya comprende uno o más sitios de glicosilación en su parte Fab y se introducen uno o más sitios de glicosilación adicionales. El(Los) sitio(s) de glicosilación recién introducido(s) porta(n) preferiblemente hidratos de carbono, en donde menos de 50%, más preferiblemente menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos del 7% o más preferiblemente menos de 5% de dichos hidratos de carbono en la composición comprenden uno o más residuos de ácido siálico. En particular, en la composición menos de 50%, preferiblemente menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 7% o más preferiblemente menos de 5% de la hidratos de carbono unidos a todos los sitios de glicosilación presentes en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprenden preferiblemente uno o más residuos de ácido siálico. Del mismo modo, este(os) sitio(s) de glicosilación recién introducido(s), cuando son glicosilados, portan preferiblemente hidratos de carbono en donde al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de dichos hidratos de carbono en la composición comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres. En particular, en la composición al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de los hidratos de carbono unidos a todos los sitios de glicosilación presentes en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprenden preferiblemente al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres. Más arriba se describe cómo se puede lograr una baja cantidad respectiva de sialilación.

Los sitios de glicosilación de Fab

25 Los uno o más sitios de glicosilación que están presentes en la parte Fab o que se van a introducir en o a remover de la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo preferiblemente son sitios de N-glicosilación y/o sitios de O-glicosilación, preferiblemente sitios de N-glicosilación, más preferiblemente sitios de N-glicosilación que tienen la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido preferiblemente excepto Pro. Ellos pueden ubicarse en cualquier lugar en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Sin embargo, están preferiblemente en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera, más preferiblemente en la región variable de cadena pesada. En particular, pueden estar en las regiones de marco y/o en las CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o de cadena ligera, preferiblemente en las regiones marco. Sin embargo, los uno o más sitios de glicosilación también se pueden ubicar en las regiones constantes de la parte Fab, en particular, la región constante 1 de cadena pesada.

35 La introducción y eliminación de un sitio de glicosilación en la parte Fab se puede conseguir mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de la parte Fab, en particular mediante la adición, sustitución y/o supresión de uno o más residuos de aminoácidos. Esto puede hacerse preferiblemente mediante modificación por ingeniería genética del ácido nucleico que codifica para los aminoácidos o fragmentos o derivados de los mismos, en particular por mutagénesis de la secuencia de ácido nucleico. Los métodos adecuados para la eliminación o introducción de un sitio de glicosilación se describen más arriba.

40 Preferiblemente, en realizaciones en las que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende dos o más regiones variables de cadena pesada, un sitio de glicosilación presente en la región variable de cadena pesada está presente en todas las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, en realizaciones en las que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende dos o más regiones constantes de cadena pesada, en particular dos o más regiones CH1, un sitio de glicosilación presente en la región constante de cadena pesada 1 está presente en todas las regiones constantes de cadena pesada 1 del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, en realizaciones en las que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende dos o más regiones variables de cadena ligera, un sitio de glicosilación presente en la región variable de cadena ligera está presente en todas las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, en realizaciones en las que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende dos o más regiones constantes de cadena ligera, un sitio de glicosilación presente en la región constante de cadena ligera está presente en todas las regiones constantes de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.

55 Aproximadamente el 30% de los anticuerpos aislados a partir de suero humano tiene un sitio de glicosilación dentro de la parte Fab. Con respecto a los anticuerpos anti-EGFR, en particular, Cetuximab, un sitio de glicosilación en la parte Fab de estos anticuerpos preferiblemente está posicionado en la región marco 3 de la región variable de cadena pesada, más preferiblemente en el aminoácido 85 de acuerdo con la numeración de Kabat. En cuanto a los anticuerpos anti-MUC1, en particular Pankomab, un sitio de glicosilación en la parte Fab de estos anticuerpos preferiblemente se posiciona en CDR2 de la región variable de cadena pesada, más preferiblemente en el aminoácido 54 de acuerdo con la numeración de Kabat.

Si al menos un sitio de glicosilación está presente en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en la composición está glicosilado en la parte Fab. Preferiblemente, al menos 25%, más preferiblemente al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más preferiblemente aproximadamente 100% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición están glicosilados en la parte Fab. Además, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más preferiblemente aproximadamente 100% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición están glicosilados en un sitio de glicosilación específico en la parte Fab como se describe en el presente documento, preferiblemente en todos los sitios de glicosilación en la parte Fab. También se pueden obtener grados más altos de anticuerpos respectivamente glicosilados, por ejemplo, por métodos de enriquecimiento, por ejemplo, después o durante el proceso de purificación.

En realizaciones preferidas, la introducción o eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no inhibe la unión del antígeno y/o la especificidad del antígeno del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Preferiblemente, la unión del antígeno y/o la especificidad del antígeno no se reducen significativamente por la introducción o eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab. Del mismo modo, también el aumento o la disminución de la cantidad de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo preferiblemente no inhibe la unión del antígeno y/o la especificidad del antígeno, y más preferiblemente no reduce significativamente la unión del antígeno y/o la especificidad del antígeno. En particular, después de llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención, la afinidad de unión del antígeno o fragmento o derivado del mismo que tiene una mayor o menor vida media en circulación para su antígeno específico es al menos 0,1%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de la afinidad de unión del antígeno o fragmento o derivado del mismo antes de controlar su vida media en circulación.

Sin embargo, en caso de que el aumento o disminución de la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a un sitio de glicosilación específico en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo afecte negativamente o esté en riesgo de afectar negativamente la unión del antígeno o la especificidad del antígeno, dicho sitio de glicosilación puede ser removido del anticuerpo y/o se pueden introducir uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab en posiciones en que no o que en menor medida influyen en la unión del antígeno y/o la especificidad del antígeno. Entonces, el contenido de ácido siálico de los hidratos de carbono unidos al(a los) sitio(s) de glicosilación recién introducido(s) puede ser aumentado o disminuido para controlar la vida media en circulación, de acuerdo con se desee. Preferiblemente, dicho(s) sitio(s) de glicosilación recién introducido(s) está(n) posicionado(s) en las regiones marco de las regiones variables o, más preferiblemente, en las regiones constantes de la parte Fab, tal como la región constante cadena pesada 1 y/o la región constante de cadena ligera.

El anticuerpo o fragmento o derivado del mismo

El anticuerpo utilizado en el método de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier anticuerpo, incluyendo los anticuerpos de origen natural, anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos modificados genéticamente, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Puede ser un anticuerpo humano, de ratón, de rata, de cabra, de primate o de camello. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. Puede ser de cualquier clase de anticuerpo, incluyendo anticuerpos IgG, IgE, IgA, IgD e IgM, y cualquier subclase, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferiblemente un anticuerpo IgG1 o IgG2, más preferiblemente un anticuerpo IgG1.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en anticuerpos anti-EGFR, tal como Cetuximab, anticuerpos anti-TF tal como Karomab, anticuerpos anti-MUC1 tal como Pankomab, anticuerpos anti-HER2 tal como trastuzumab, anticuerpos anti-CD20 tal como Rituximab, anticuerpos anti-A β tal como Solanezumab, anticuerpos anti-CD52, tal como Alemtuzumab, y versiones quiméricas o humanizadas de los mismos.

Los anticuerpos anti-EGFR preferidos se describen en el documento WO 96/40210 (que describe en particular versiones humanizadas y quiméricas del anticuerpo 225) y la patente estadounidense No. 4.943.533 que describe el anticuerpo murino 225 y/o comprende una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR quimérico o humanizado que comprende

(i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

5 (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 85 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y

(iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.

Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Cetuximab y/o el anticuerpo 225.

10 Preferiblemente, los anticuerpos anti-MUC1 se describen en las solicitudes de patente WO 04/065423 y EP 09 009 942.5, incorporada aquí por referencia, y/o comprenden una o más de las CDR seleccionados de entre el grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-TA-MUC1 quimérico o humanizado que comprende

15 (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;

20 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

(iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 54 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y

25 (iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.

Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Pankomab. En particular, el anticuerpo anti-TA-MUC1 quimérico o humanizado es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos PDTR (SEQ ID NO: 13) o, más preferiblemente PDTRP (SEQ ID NO: 14). La unión a este epítipo preferiblemente es dependiente de la glicosilación, en donde en particular, se incrementa la unión si una fracción de hidrato de carbono se une al residuo de treonina de la secuencia PDTR o PDTRP, respectivamente. Preferiblemente, la unión se incrementa si el epítipo está glicosilado en el residuo de treonina con una fracción de hidrato de carbono seleccionado del grupo que consiste en N-acetilgalactosamina (Tn), sialil α 2-6 N-acetilgalactosamina (sTN), galactosa β 1-3 N-acetilgalactosamina (TF) y galactosa β 1-3 (sialil α 2-6) N-acetilgalactosamina (sTF), preferiblemente con Tn o TF. Preferiblemente, la fracción de hidrato de carbono está unida al residuo de treonina mediante un enlace α -O-glucosídico. En algunas realizaciones, la dependencia de la glicosilación de la unión se debe a la conformación específica que el epítipo adopta cuando es glicosilado, en particular por las fracciones de hidratos de carbono específicos mencionados anteriormente. En este caso, el anticuerpo no necesariamente tiene que unirse a la fracción de hidrato de carbono, sino que puede unirse solamente a la fracción de péptido del epítipo en donde la afinidad de esta unión depende de la conformación del epítipo. Preferiblemente, el epítipo está comprendido en las repeticiones extracelular en tándem de la proteína de mucina MUC1. En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de unirse a un epítipo de mucina asociado al tumor, en particular un epítipo MUC1 asociado al tumor tal como el epítipo TA-MUC1 (véase Karsten, U. y colaboradores (2004) *Glycobiology* 14, 681-692 y Danielczyk, A. y colaboradores (2006) *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1337-1347). El epítipo de mucina 1 asociado al tumor TA-MUC1, se refiere preferiblemente a un epítipo de MUC1 que está presente en células tumorales pero no en células normales y/o que sólo es accesible por los anticuerpos en la circulación del huésped cuando están presentes en las células tumorales pero no cuando están presente en las células normales.

Los anticuerpos anti-CD52 preferidos comprenden una o más de las CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD52 que comprende

- (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y un CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;
- 5 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
- (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 60 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- 10 (iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.
- Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Alemtuzumab.
- Los anticuerpos anti-A β preferidos comprenden una o más de las CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-A β que comprende
- 15 (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;
- (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;
- 20 (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 55 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- (iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.
- 25 Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Solanezumab.
- 30 Además de los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab, el anticuerpo puede comprender también uno o más sitios de glicosilación en la parte Fc. Preferiblemente, comprende los sitios de glicosilación de origen natural de la parte Fc. Por ejemplo, puede comprender un sitio de glicosilación en la región CH2, en particular en Asn297 en el caso de los anticuerpos IgG. En estas realizaciones, preferiblemente al menos un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en la composición está glicosilado en la parte Fc. Preferiblemente, al menos 25%, más preferiblemente al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% y lo más preferiblemente aproximadamente 100% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición están glicosilados en la parte Fc.
- 35 El fragmento o derivado del anticuerpo comprende al menos la región variable de cadena pesada del anticuerpo. Preferiblemente, además comprende la región constante de cadena pesada 1 del anticuerpo, y/o la región variable de cadena ligera del anticuerpo y/o la región constante de cadena ligera del anticuerpo. En una realización preferida, el fragmento o derivado del anticuerpo comprende toda la parte Fab del anticuerpo.
- 40 El fragmento o derivado del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- 45 (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de la cadena pesada y la cadena ligera;
- (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra;

- (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada;
- (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo;
- (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido;
- 5 (vi) fragmentos (Fv)₂ que constan de dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí;
- (vii) un dominio variable de cadena pesada; y
- (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidas covalentemente entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.
- 10 El fragmento o derivado preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, preferiblemente el mismo epítipo, como el anticuerpo.
- El patrón de glicosilación
- En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo cuya vida media en circulación es controlada por el método de acuerdo con la presente invención y que está comprendido en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención tiene características de glicosilación adicionales que le proporcionan al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, ciertas propiedades deseables.
- 15 Los hidratos de carbono en los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos son preferiblemente hidratos de carbono de tipo complejo. En particular, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% y lo más preferiblemente aproximadamente 100% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab y/o la parte Fc de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos tienen la estructura central mostrada en la Figura 21B, en donde un cuadrado negro representa un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un círculo gris representa un residuo de manosa (Man). Más preferiblemente, los hidratos de carbono que tienen dicha estructura central son hidratos de carbono de tipo complejo, tales como hidratos de carbono de tipo complejo biantenarios que tienen la estructura mostrada en la Figura 21C, en donde un cuadrado negro representa un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc), un círculo gris representa un residuo de manosa (Man), un círculo blanco representa un residuo de galactosa (Gal), un rombo gris representa un residuo de ácido siálico (SA), un triángulo negro representa un residuo de fucosa (Fuc) y un cuadrado gris representa un residuo de N-acetilglucosamina (bisGlcNAc) que se divide en dos; y en donde GlcNAc, Gal y SA en las ramas de los hidratos de carbono, bisGlcNAc así como Fuc sólo están opcionalmente presentes en la estructura de hidratos de carbono y también pueden estar ausentes. En particular, los residuos opcionales están presentes en las cantidades como se describe aquí.
- 20
- 25
- 30
- En particular, en la composición del anticuerpo al menos 50% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan al menos un residuo de galactosa. Más preferiblemente, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75% o al menos 80% de dichos hidratos de carbono en la composición portan al menos un residuo de galactosa. En realizaciones preferidas, en la composición del anticuerpo al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan al menos un residuo de galactosa. Más preferiblemente, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o al menos 90% de dichos hidratos de carbono en la composición portan al menos un residuo de galactosa. Este residuo de galactosa es preferiblemente un residuo de galactosa terminal, en particular unido a un residuo de N-acetilglucosamina, en particular posicionado en el terminal de una o más ramificaciones de las cadenas de hidratos de carbono, opcionalmente portando además un residuo de ácido siálico. El término "terminal" a este respecto únicamente se refiere a la posición del residuo de galactosa en la cadena de hidrato de carbono, en particular a su posición en una de las ramificaciones de la cadena de hidrato de carbono. Esto no significa que el residuo de galactosa tiene que ser la última unidad de monosacárido en el extremo no reductor de la cadena de hidratos de carbono. En particular, una unidad de galactosa terminal puede portar además, un residuo de ácido siálico.
- 35
- 40
- 45
- 50
- En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tiene un patrón de glicosilación humano o de tipo humano. En particular, los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, preferiblemente no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura Gal α (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc. Preferiblemente, no comprenden la estructura Gal α (1 \rightarrow 3)Gal. Los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo preferiblemente tampoco comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Además, en la composición preferiblemente al menos 25% del ácido siálico de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo están acoplados mediante un enlace 2,6. Más preferiblemente, en la composición al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65% o al menos 68% del ácido siálico de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo están acoplados por un enlace

2,6.

5 Mediante el uso de un patrón de glicosilación que es similar a la glicosilación humana natural, se reducen los efectos secundarios adversos causados por la administración de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos. En particular, se deben evitar las estructuras de hidratos de carbono tales como el epítipo Galili, NeuGc o una alta cantidad de ácidos siálicos enlazados 2,3 ya que podrían elevar una respuesta inmune por el sistema inmune del paciente. Por ejemplo, se pueden evitar las respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) mediante el uso de anticuerpos quiméricos o preferiblemente humanizados que tiene un patrón de glicosilación similar al humano. En particular, se sabe que el epítipo Galili causa un gran número de reacciones de hipersensibilidad graves. En particular, el anticuerpo anti-EGFR quimérico Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Erbix) comprende hidratos de carbono que portan el epítipo Galili y NeuGc y por lo tanto, induce reacciones inmunitarias contra el anticuerpo en pacientes humanos. Los anticuerpos obtenidos por el método de acuerdo con la presente invención, en particular anticuerpos de EGFR, tales como anticuerpos Cetuximab quiméricos o humanizados o anticuerpos que tienen el mismo epítipo que Cetuximab obtenidos por el método de acuerdo con la presente invención y que pueden estar comprendidos en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención no comprenden estas estructuras desventajosas de hidratos de carbono.

20 Además, en la composición de acuerdo con la presente invención preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 15%, al menos 20%, al menos 23%, al menos 25%, al menos 27%, al menos 29% o al menos 30% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan un residuo bisectante de N-acetilglucosamina (bisGlcNAc). En particular, en la composición preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, al menos 60%, al menos 65% o incluso al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan bisGlcNAc.

25 En ciertas realizaciones, en la composición de acuerdo con la presente invención no más de 50%, preferiblemente no más de 40%, no más de 30%, no más de 25%, no más de 20%, no más de 15 %, no más de 13% o no más de 10% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan un residuo de fucosa. En realizaciones adicionales, en la composición de acuerdo con la presente invención preferiblemente al menos 1%, más preferiblemente al menos 2%, al menos 5%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9% o al menos 10% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan un residuo de fucosa.

Actividad biológica mejorada

30 En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos que tienen una mayor vida media en circulación, tienen adicionalmente una actividad biológica mejorada. La actividad biológica de los anticuerpos en este sentido incluye, por ejemplo, ADCC y CDC. La actividad biológica mejorada se consigue principalmente por el patrón de glicosilación optimizado, en particular, el patrón de glicosilación optimizado en la parte Fc de los anticuerpos. Por ejemplo, la actividad de ADCC de anticuerpos del tipo IgG está mediada por la unión del anticuerpo a receptores de Fc γ , en particular Fc γ RIIIa, a través de su parte Fc. Fc γ RIIIa se expresa en células asesinas naturales (NK) y macrófagos y tras la activación por un anticuerpo induce la liberación de citoquinas y gránulos citotóxicos que se traduce en la apoptosis de la célula objetivo unida por el anticuerpo. La afinidad de unión del anticuerpo al receptor de Fc γ está influenciada por los hidratos de carbono unidos a los sitios de glicosilación en la parte Fc del anticuerpo. Por lo tanto, la optimización del patrón de glicosilación en la parte Fc de un anticuerpo dará lugar a una unión más fuerte de Fc γ RIIIa y, por tanto, a una actividad mejorada de ADCC.

40 La eficacia terapéutica de los anticuerpos - además de su vida media en circulación - en muchos casos depende de la inducción de efectos citotóxicos, en particular ADCC, contra las células objetivo unidas por el anticuerpo. Por lo tanto, el aumento de la actividad de ADCC de un anticuerpo aumenta el valor terapéutico del mismo. Por ejemplo, la misma cantidad de anticuerpos administrados a un paciente logrará un beneficio terapéutico mucho mayor cuando se utilizan anticuerpos optimizados por su actividad de ADCC. Además, para lograr el mismo efecto terapéutico, se tiene que administrar una cantidad mucho menor de estos anticuerpos. Como se discute aquí, también el aumento de la vida media en circulación del anticuerpo se traduce en un efecto terapéutico mejorado. Por lo tanto, una combinación de ambas características, el aumento de vida media en circulación y el aumento de actividad biológica, proporciona anticuerpos terapéuticos altamente ventajosos.

50 Sin embargo, ambas propiedades se optimizan preferiblemente mediante el control del patrón de glicosilación de los anticuerpos. En particular, un mayor grado de sialilación en la parte Fab de los anticuerpos aumenta su vida media en circulación, mientras que un grado reducido de fucosilación en la parte Fc de los anticuerpos aumenta su actividad de ADCC. Además, un alto grado de sialilación en la parte Fc puede interferir con la actividad de ADCC. Es un logro de la presente invención combinar ambas características en una composición del anticuerpo y, por tanto, proporcionar anticuerpos que tienen un patrón de glicosilación en la parte Fab optimizado para una alta vida media en circulación y que tienen un patrón de glicosilación en la parte Fc optimizado para una alta actividad biológica.

55 Se ha encontrado que, en particular, una cantidad reducida de fucosa, una mayor cantidad de GlcNAc bisectante y/o

una cantidad reducida de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a la parte Fc de un anticuerpo IgG aumentará la afinidad del anticuerpo por FcγRIIIa y/o su actividad de ADCC.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la invención tienen una baja cantidad de fucosa en los hidratos de carbono unidos a la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Alternativamente, o además de esta baja cantidad de fucosa, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos pueden tener preferiblemente una alta cantidad de GlcNAc bisectante y/o una baja cantidad de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a la parte Fc. Tal patrón de glicosilación en la parte Fc de los anticuerpos se traduce en un aumento de la actividad de ADCC de los anticuerpos.

En realizaciones preferidas, en la composición de acuerdo con la presente invención preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95% o al menos 97% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no portan un residuo de fucosa. Un bajo contenido de fucosa en la glicosilación en la parte Fc del anticuerpo en particular, es importante para una alta citotoxicidad mediada por células que depende del anticuerpo (ADCC) del anticuerpo. Especialmente en el caso de anticuerpos IgG, una alta cantidad de fucosa en la glicosilación de Fc reduce la afinidad del anticuerpo por el receptor de Fcγ, en particular, por FcγRIIIa que se expresa mediante células asesinas naturales y macrófagos y media la ADCC. Además, una baja cantidad de fucosa en los hidratos de carbono unidos a los sitios de glicosilación en la parte Fc de anticuerpos IgG también reduce las diferencias en la afinidad de unión del anticuerpo para las diferentes variantes polimórficas de FcγRIIIa humana (FcγRIIIa-158F y FcγRIIIa-158V). Por lo tanto, los anticuerpos IgG que tienen una baja cantidad de fucosa en los hidratos de carbono unidos a la parte Fc, en particular una cantidad de fucosa como se describió anteriormente, se pueden utilizar para el tratamiento de los pacientes mediante la administración de una cantidad del anticuerpo que no causa un efecto terapéutico cuando se administra el mismo anticuerpo que tiene un alto contenido de fucosa en la parte Fc.

Además, mediante el uso de estos anticuerpos de baja fucosa, los pacientes que tienen diferentes variantes polimórficas de FcγRIIIa, tal como los pacientes FcγRIIIa-158F homocigotos, pacientes FcγRIIIa-158V homocigotos y pacientes FcγRIIIa-158F/V heterocigotos, pueden ser tratados con la misma cantidad de anticuerpo con una respuesta similar a la misma cantidad de anticuerpo administrado. En particular, la unión de los anticuerpos con alto contenido de fucosa en su parte Fc tienen una afinidad especialmente reducida por FcγRIIIa-158F. De este modo, utilizando dichos anticuerpos de baja fucosa, se amplía la cobertura del paciente con la terapia de anticuerpos. Esto también se demuestra en los ejemplos en los que se utilizan composiciones de anticuerpos respectivos de acuerdo con la presente invención.

Además, en la composición de acuerdo con la presente invención, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 7%, al menos 10%, al menos 12%, al menos 15%, al menos 18%, al menos 20% o al menos 22% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan bisGlcNAc. A mayor cantidad de bisGlcNAc en la parte Fc de un anticuerpo, en particular un anticuerpo IgG, puede traducirse en una mayor ADCC del anticuerpo.

Además, en la composición de acuerdo con la presente invención, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95% o al menos 97% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no portan un residuo de ácido siálico. Además, en la composición de acuerdo con la presente invención, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95% o al menos 97% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no portan dos o más residuos de ácido siálico. Un mayor grado de sialilación en la parte Fc del anticuerpo puede tener una influencia negativa sobre la unión a los receptores de Fc, en particular FcγRIIIa, y por lo tanto en la ADCC del anticuerpo. Las células y líneas celulares utilizadas para la producción de estas composiciones de anticuerpos preferiblemente son capaces de proporcionar anticuerpos que tienen un alto grado de sialilación en la parte Fab y un bajo grado de sialilación en la parte Fc. Un ejemplo de una línea celular adecuada es la línea celular GT-5s y células y líneas celulares derivadas de la misma u homólogas a la misma.

La composición del anticuerpo

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición del anticuerpos que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos, caracterizada porque los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprenden al menos un sitio de glicosilación presente en su parte Fab, y caracterizado porque en la composición al menos 65% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos un residuo terminal de ácido siálico y/o menos de 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos dos unidades de galactosa libres; en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que constan de la región variable y el primer

5 dominio constante de cada uno de la cadena pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que
 comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de
 la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región
 variable de cadena pesada y cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que
 consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos
 covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región
 variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidos covalentemente entre sí de tal manera que la
 asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir en forma intermolecular
 pero no intramolecular. Las características preferidas de la composición del anticuerpo y, en particular, los patrones de
 10 glicosilación preferidos se describen más arriba en relación con el patrón de glicosilación y a continuación.

Preferiblemente, al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al
 menos 97%, al menos 98%, al menos 99% y más preferiblemente aproximadamente 100% de los anticuerpos o
 fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención
 reconocen, se unen a y/o son específicos para el mismo antígeno, preferiblemente el mismo epítipo.

15 La composición del anticuerpo preferiblemente se puede obtener o es de hecho obtenida por el método para controlar la
 vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención
 en donde se incrementa la cantidad de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a uno o más sitios de
 glicosilación presentes en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.

20 En particular, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo de acuerdo con
 la presente invención tienen preferiblemente una o más de las características descritas anteriormente con respecto al
 método para controlar la vida media en circulación de acuerdo con la invención. En particular, las características y, en
 particular, el patrón de glicosilación del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, respectivamente, la composición
 que comprende los mismos, que se describe junto con el método para controlar la vida media en circulación de acuerdo
 con la invención, las características del sitio de glicosilación de Fab, y las características del patrón de glicosilación, tal
 como se describió anteriormente, puede también ser aplicadas a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los
 25 mismos en la composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

En formas de realización preferidas, al menos 68%, al menos 70%, al menos 75% o al menos 80% de los hidratos de
 carbono unidos a la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que porta
 al menos un residuo de ácido siálico terminal. En particular, la cantidad promedio de residuos de ácido siálico por
 30 cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la
 parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición es al menos 0,65,
 preferiblemente al menos 0,7, al menos 0,75, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,05, o al menos 1,1.
 Además, preferiblemente menos de 30%, menos de 25%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de
 7% o menos de 5% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los
 35 mismos en la composición portan dos o más unidades de galactosa libres. En particular, la cantidad media de unidades
 de galactosa libres por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de
 glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición es
 de menos de 1,2, preferiblemente menos de 1,1, menos de 1,0, menos de 0,9, menos de 0,85, menos de 0,8, menos de
 0,75 o menos de 0,7.

40 Preferiblemente, al menos un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en la composición está glicosilado en la
 parte Fab. Más preferiblemente, al menos 25%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos
 75%, al menos 80%, al menos 85% o al menos 90% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la
 composición están glicosilados en la parte Fab. Además, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos
 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, o más
 45 preferiblemente al menos 90% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición están
 glicosilados en un sitio de glicosilación específico en la parte Fab como se describe en la presente memoria,
 preferiblemente en todos los sitios de glicosilación presentes en la parte Fab. Los anticuerpos o fragmentos o derivados
 de los mismos también pueden ser enriquecidos por un patrón de glicosilación respectivo, por ejemplo, durante o
 después de su purificación.

50 Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo comprenden
 además al menos un sitio de glicosilación en su parte Fc. Este sitio de glicosilación preferiblemente está glicosilado con
 hidratos de carbono en donde la cantidad de hidratos de carbono en la composición que portan un residuo de fucosa es
 preferiblemente menor al 50%, más preferiblemente menor al 40%, menor al 30%, menor al 25%, menor al 20%, menor
 al 15%, preferiblemente menor al 10% y más preferiblemente menor al 5%. Además, en la composición la cantidad de
 55 hidratos de carbono unidos a la parte Fc que porta uno o más residuos de ácido siálico preferiblemente es menor al
 50%, más preferiblemente menor al 40%, menor al 30%, menor al 25%, menor al 20%, menor al 15%, menor al 10%, y
 más preferiblemente menor al 7% o menor al 5%.

Los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición preferiblemente tienen un patrón de

ES 2 605 304 T3

glicosilación que se enumera en la siguiente tabla:

Realización	Sitio de glicosilación	B	F	S>0	S2	G>0	G2	G libre
1	Fab	≥50		≥65		≥70		
2	Fab	≥50				≥70		<35
3	Fab	≥50		≥65		≥70		<35
4	Fab	≥50		≥65	≥25	≥70		
5	Fab	≥50		≥65		≥70	≥70	
6	Fab	≥50		≥65	≥25	≥70	≥70	
7	Fab	≥50		≥70		≥70		
8	Fab	≥50		≥65		≥80		
9	Fab	≥60		≥65		≥70		
10	Fab	≥60		≥70		≥80		
11	Fab	≥50				≥70		<40
12	Fab	≥50		≥65	≥30	≥70		
13	Fab	≥50		≥65		≥80	≥80	
14	Fab	≥60		≥70	≥30	≥80	≥80	
15	Fab	≥60		≥70	≥30	≥80	≥80	<40
16	Fc	≥5	<50	<40				
17	Fc	≥5	<50	<40	<25			
18	Fc	≥5	<50	<40		≥50		
19	Fc	≥5	<50	<40	<25	≥50		
20	Fc	≥12	<50	<40				
21	Fc	≥5	<80	<40				
22	Fc	≥5	<50	<25				
23	Fc	≥12	<80	<25				
24	Fc	≥5	<50	<40	<15			
25	Fc	≥5	<50	<40		≥60		
26	Fc	≥12	<80	<25	<15	≥60		

27	Fc	≥5		<40			
28	Fc	≥5		<40	<25	≥50	
29	Fc	≥12		<25	<15	≥60	
<p>se muestran los valores porcentuales de los hidratos de carbono unidos a la parte indicada de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición que tiene la siguiente propiedad:</p> <p>B: GlcNAc bisectante; F: fucosa; S > 0: al menos un ácido siálico; S2: dos ácidos siálicos; G > 0: al menos una galactosa; S2: dos galactosas; G libre: al menos una unidad de galactosa libre</p>							

5 Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición tiene una combinación de una realización de un patrón de glicosilación de Fab (formas de realización 1 a 15) y una realización de un patrón de glicosilación de Fc (formas de realización 16 a 29), por ejemplo la realizaciones 1 y 16, las realizaciones 6 y 19, las realizaciones 10 y 23, las realizaciones 15 y 26, las realizaciones 1 y 27, las realizaciones 4 y 28 y las realizaciones 14 y 29.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo no portan hidratos de carbono que comprenden el epítipo Galili y/o residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc).

10 Los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante la expresión en una línea celular adecuada, en particular, una línea celular humana, preferiblemente una línea celular humana inmortalizada, tal como una línea celular de sangre humana, en particular, una línea celular mieloide humana o línea celular de leucemia mieloide humana. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo de acuerdo con la invención se obtienen mediante la expresión en la línea celular GT-5s (DSM ACC 3078) o una célula o línea celular derivada de la misma o una célula o línea celular homóloga a la misma como se definió anteriormente, en particular, una línea celular que tiene una actividad baja o nula de fucosilación tal como una línea celular seleccionada por baja fucosilación mediante selección de clones individuales o mediante modificación genética de la línea celular, por ejemplo, por desactivación de genes. En particular, en las líneas celulares que no tienen baja o ninguna actividad de fucosilación, pueden estar presentes uno o más defectos en la ruta de biosíntesis de fucosa y/o el sistema de transporte de fucosa y/o las enzimas fucosilación. Las enzimas objetivo cuya actividad puede ser disminuida o estar ausente se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en α 1,6-fucosiltransferasa codificada por el gen FUT8, GDP-manosa-4,6-deshidratasa, GDP-4-ceto-6-desoximannosa-3,5-epimerasa-4-reductasa, y GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa. El defecto puede dar como resultado la expresión de una proteína que tiene una disminución o ausencia de actividad o puede reducir o inhibir la expresión del gen. Además, también se puede lograr un bajo contenido de fucosa por métodos biológicos que no alteran la estructura genética de la célula tal como ARN interferente.

30 Además, la presente invención proporciona una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-EGFR quimérico o humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, caracterizada porque el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 85 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat, en donde en la composición al menos 65%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos un residuo de ácido siálico terminal, en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro.

40 Como se describió anteriormente, las composiciones respectivas de los anticuerpos muestran una mejor vida media en comparación con las composiciones de anticuerpos que no tienen un patrón de glicosilación respectivo. Preferiblemente, el anticuerpo anti-EGFR quimérico o humanizado comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fc y en la composición al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferible al menos 95% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de fucosa. Además, preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferible al menos 95% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de ácido siálico. Además, de acuerdo con una forma de realización, al menos 10% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante, al menos 70% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo portan al menos un residuo de galactosa (este residuo de galactosa preferiblemente es una residuo de

galactosa terminal, en particular unido a un residuo de N-acetilglucosamina, en particular situado en el terminal de una o más ramificaciones de las cadenas de hidratos de carbono, que portan opcionalmente además un residuo de ácido siálico), los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura Gal α (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc, y los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Además, de acuerdo con una realización, al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, lo más preferiblemente al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab portan a un residuo de N-acetilglucosamina bisectante. De acuerdo con una realización, al menos 25% o al menos 30%, preferiblemente al menos 40% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo comprenden ácido siálico. De acuerdo con una realización, la composición del anticuerpo respectivo combina todas las características descritas anteriormente como preferidas. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. De acuerdo con una realización, se proporciona una composición del anticuerpo, que comprende fragmentos funcionales o derivados de un anticuerpo glicosilado respectivamente.

Además, la presente invención también proporciona una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-MUC1 quimérico o humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, caracterizada porque el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 54 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat, en donde en la composición al menos 65%, preferiblemente al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos un residuo de ácido siálico terminal, y/o menos de 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos dos unidades de galactosa libres; en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro. Como se describió anteriormente, las composiciones de anticuerpos respectivos muestran una mejor vida media en comparación con las composiciones de anticuerpos que no tienen un patrón de glicosilación respectivo.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-MUC1 quimérico o humanizado comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fc y en la composición al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferible al menos 95% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de fucosa y/o al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de ácido siálico. Además, de acuerdo con una realización, al menos 5% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante, al menos 70% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo portan al menos un residuo de galactosa (este residuo de galactosa es preferiblemente un residuo de galactosa terminal, en particular unido a un residuo de N-acetilglucosamina, en particular situado en el terminal de una o más ramificaciones de las cadenas de hidratos de carbono, opcionalmente que portan además un residuo de ácido siálico), los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura Gal α (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc, y los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). De acuerdo con una realización, la composición del anticuerpo respectivo combina todas las características descritas anteriormente como preferidas. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. De acuerdo con una realización, se proporciona una composición del anticuerpo, que comprende fragmentos funcionales o derivados de un anticuerpo glicosilado respectivamente.

Un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos de al menos una CDR del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva de un anticuerpo de referencia que comprende al menos un sitio de glicosilación en la parte Fab, y en donde el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no comprende un sitio de glicosilación en la parte Fab, puede tener una mayor vida media en circulación que el anticuerpo de referencia.

Como se discutió anteriormente, eliminando el(los) sitio(s) de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se traduce en un aumento de la vida media en circulación en comparación con el anticuerpo de referencia que comprende un sitio de glicosilación en la parte Fab. Cuanto mayor vida media en circulación se puede observar en al menos una especie, preferiblemente se observa en un primate, preferiblemente en un ser humano. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se une al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se derivan del anticuerpo de referencia. Además, preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se derivan del anticuerpo de referencia. En realizaciones preferidas, las secuencias de aminoácidos de las CDR que se derivan del anticuerpo de referencia son idénticas a las secuencias de aminoácidos de las correspondientes CDR del anticuerpo de referencia.

- 5 En realizaciones preferidas, la secuencia completa de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y/o toda la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva a partir del anticuerpo de referencia. En ciertas realizaciones, el sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo de referencia está en la región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo de referencia y el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, comprende al menos una mutación de aminoácido en la región variable de cadena pesada o cadena ligera derivada del anticuerpo de referencia cuya mutación del aminoácido remueve dicho sitio de glicosilación. En realizaciones adicionales, toda la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva del anticuerpo de referencia en donde sin embargo, no comprende un sitio de glicosilación en el fragmento Fab.
- 10 La afinidad de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo preferiblemente es similar o mayor que la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia. Preferiblemente, la afinidad de unión al antígeno no se reduce en más de un 20%, preferiblemente no más de 15%, no más de 10% o no más de 5%. Además, de acuerdo con una forma de realización, la vida media en circulación del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo es al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% más alta que la vida media en circulación del anticuerpo de referencia. Como se discutió anteriormente, el aumento de la vida media en circulación se observa en al menos una especie, preferiblemente en un primate, más preferiblemente en un humano.
- 15 El anticuerpo de referencia se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en anticuerpos anti-EGFR, en particular, anticuerpos anti-EGFR como se describió anteriormente, por ejemplo Cetuximab o anticuerpos que se unen al mismo epítipo que Cetuximab, anticuerpos anti-MUC1, en particular anticuerpos anti-MUC1 como los descritos anteriormente, por ejemplo Pankomab o anticuerpos que se unen al mismo epítipo que Pankomab, anticuerpos anti-A β como Solanezumab o anticuerpos que se unen al mismo epítipo que Solanezumab, y anticuerpos anti-CD52, tales como Alemtuzumab o anticuerpos que se unen al mismo epítipo que Alemtuzumab.
- 20 Los anticuerpos anti-EGFR preferidos y los anticuerpos anti-MUC1 preferidos y sus secuencias de CDR se describieron anteriormente. Se hace referencia a la descripción anterior, que también se aplica aquí. Estos anticuerpos se usan preferiblemente como anticuerpo de referencia. Como se discutió anteriormente, el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo comprende preferiblemente al menos una, preferiblemente todas las CDR de los anticuerpos respectivos.
- 25 Los anticuerpos anti-CD52 preferidos también se describieron anteriormente y comprenden una o más de las CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD52 que comprende
- 30 (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;
- 35 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
- 40 (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 60 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- (iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.
- 45 Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Alemtuzumab.
- Los anticuerpos anti-A β preferidos también han sido descritos anteriormente y comprenden una o más de las CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-A β que comprende
- 50 (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 21, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

5 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

(iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 55 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y

(iv) opcionalmente un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.

10 Dicho anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, el mismo epítipo que Solanezumab.

Los ejemplos de anticuerpos de referencia también se enumeran en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Nombre comercial	Antígeno	Línea celular de expresión	uso terapéutico
Cetuximab	Erbix	EGFR	Línea celular de mieloma de ratón SP2/0	tratamiento del cáncer, por ejemplo cáncer colorrectal metastásico y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Pankomab	-	MUC1	NM-F9 (DSM ACC2606)	tratamiento del cáncer, por ejemplo cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón y cáncer urotelial
Solanezumab	-	Beta amiloide (A β)	Línea celular de mieloma de ratón SP2/0	tratamiento de la enfermedad de Alzheimer
Alemtuzumab	Campath	CD52	Línea celular CHO	tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL), el linfoma cutáneo de células T (CTCL), el linfoma de células T y la esclerosis múltiple

15 Anteriormente se describieron detalles con respecto al sitio de glicosilación de Fab, mencionados en la descripción anterior. El sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo de referencia es preferiblemente un sitio de N-glicosilación, en particular, que tiene la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido preferiblemente excepto Pro.

20 En realizaciones preferidas, el sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo de referencia está en la región variable de cadena pesada o cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo difiere de la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia en al menos un aminoácido de modo que se remueve el sitio de glicosilación en la región variable de cadena pesada o cadena ligera.

25 El sitio de glicosilación en el anticuerpo de referencia se puede eliminar mediante cualquier método conocido en la técnica y, en particular, mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. También se han descrito anteriormente las opciones, mencionadas en la descripción anterior. Preferiblemente, se remueve el sitio de glicosilación mediante la adición, sustitución y/o supresión de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia. En particular, se elimina o sustituye el aminoácido del sitio de glicosilación que funciona como aceptor de la cadena de hidratos de carbono por otro aminoácido que no puede funcionar como aceptor para la cadena de hidratos de carbono, y/o se altera la secuencia de reconocimiento de la enzima responsable de la glicosilación del anticuerpo, en particular, oligosacariltransferasa, de manera que la enzima no puede reconocer la secuencia de aminoácidos y, por tanto, no puede transferir la cadena de hidratos de carbono en la cadena de polipéptido del anticuerpo. En particular, para la eliminación de un sitio de N-glicosilación, se altera la secuencia de aminoácidos del sitio de glicosilación Asn

Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier residuo de aminoácido preferiblemente excepto Pro, de manera que (i) se suprime o sustituye Asn por cualquier otro aminoácido, (ii) se suprime o sustituye Ser o Thr con cualquier aminoácido excepto Ser y Thr, (iii) se suprime o sustituye Xaa con Pro, y/o (iv) se introduce un aminoácido adicional entre Asn y Ser/Thr.

5 Además, una composición del anticuerpo puede comprender anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos como se describió anteriormente que, en comparación con el anticuerpo de referencia correspondiente, no comprender un sitio de glicosilación en la parte Fab. Se hace referencia a la descripción anterior para los detalles del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo. La composición del anticuerpo puede tener cualquiera de las características descritas en este documento con respecto a las composiciones de anticuerpos descritas anteriormente.
 10 En particular, los anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos en la composición pueden tener un patrón de glicosilación en la parte Fc como se ha definido y descrito anteriormente.

Un método para producir un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una mayor vida media en circulación, puede comprender las etapas de:

15 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab (anticuerpo de referencia); y

(b) introducir una mutación en el ácido nucleico de modo que se elimina el sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo codificado o un fragmento funcional o derivado del mismo.

20 Por lo tanto, se obtiene un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo original (en este documento también se denomina como anticuerpo de referencia), pero que tiene una mayor vida media en circulación. Como se discutió anteriormente, el aumento de la vida media en circulación se observa preferiblemente en al menos una especie, preferiblemente en un primate, lo más preferido en un ser humano. Los detalles con respecto a los anticuerpos de referencia adecuados y preferidos se describieron anteriormente; se mencionan en la descripción anterior. La afinidad de unión al antígeno del anticuerpo obtenido o fragmento funcional o derivado del mismo preferiblemente es similar o mayor que la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia.
 25 Preferiblemente, la afinidad de unión al antígeno no se reduce en más de un 20%, preferiblemente no más de 15%, no más de 10% o no más de 5%. Además, de acuerdo con una forma de realización, la vida media en circulación del anticuerpo obtenido o fragmento funcional o derivado del mismo es al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% más alta que la vida media en circulación del anticuerpo de referencia. Como se discutió anteriormente, el aumento de la vida media en circulación se observa en al menos una especie, preferiblemente en un primate, más preferiblemente en un humano. Los métodos adecuados para la eliminación de un sitio de glicosilación en la parte Fab se han descrito anteriormente, se mencionan en la respectiva divulgación.
 30

Un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una mayor vida media en circulación, puede comprender las etapas de:

35 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab (anticuerpo de referencia);

(b) introducir una mutación en el ácido nucleico de modo que se elimina el sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo codificado o un fragmento funcional o derivado del mismo;

40 (c) expresar el ácido nucleico obtenido en la etapa (b) en una célula huésped para producir un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que no tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab y que tiene una mayor vida media en circulación que el anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab.

45 El anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se puede obtener, por ejemplo, a partir del medio de cultivo que comprende las células huésped. Las células huésped adecuadas para expresión de anticuerpos son conocidas en el estado de la técnica y también han sido descritas anteriormente. Preferiblemente, se purifica el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo. Anteriormente se describieron los detalles con respecto al anticuerpo de referencia y al anticuerpo mutado obtenido no comprenden un sitio de glicosilación en el fragmento Fab. Se mencionaron en la descripción anterior.

50 Además, se describen un ácido nucleico que se puede obtener a partir del método para producir un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una mayor vida media en circulación y un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que se puede obtener a partir del método para la producción de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una mayor vida media en circulación.

5 Un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos de al menos una CDR del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva de un anticuerpo de referencia, y en donde el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab que no está presente en el anticuerpo de referencia puede tener una menor vida media en circulación que el anticuerpo de referencia. El anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo tiene preferiblemente un bajo grado de sialilación y/o un alto grado de unidades de galactosa libres en la parte Fab, en particular una cantidad de ácidos siálicos y/o una cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab como se describió anteriormente con respecto a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que tienen una disminución de la vida media en circulación, es decir, obtenida después de la etapa (b1) o (b2) del método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo de acuerdo con la invención. Se hace referencia a la descripción anterior que igualmente aplica aquí.

10 Como se discutió anteriormente, la adición de (a) sitio(s) de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo puede resultar en una disminución de la vida media en circulación en comparación con el anticuerpo de referencia que no comprende un sitio de glicosilación respectivo en la parte Fab. La menor vida media en circulación puede observarse en al menos una especie, preferiblemente se observa en un primate, preferiblemente en un ser humano. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se une al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

15 Preferiblemente, el anticuerpo de referencia no comprende un sitio de glicosilación en la parte Fab.

20 Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de todas las tres CDR de la región variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se derivan del anticuerpo de referencia. Además, preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se derivan del anticuerpo de referencia. En realizaciones preferidas, las secuencias de aminoácidos de las CDR que se derivan del anticuerpo de referencia son idénticas a las secuencias de aminoácidos de las correspondientes CDR del anticuerpo de referencia.

25 En realizaciones preferidas, la secuencia completa de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y/o la secuencia completa de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva a partir del anticuerpo de referencia. En ciertas realizaciones, el sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se encuentra en la región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo de referencia y el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, comprende al menos una mutación de aminoácido en la región variable de cadena pesada o cadena ligera derivada del anticuerpo de referencia cuya mutación de aminoácido introduce dicho(s) sitio(s) de glicosilación. En realizaciones adicionales, toda la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se deriva del anticuerpo de referencia, en donde sin embargo, comprende al menos un sitio de glicosilación adicional en el fragmento Fab.

30 La afinidad de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo preferiblemente es similar a o mayor que la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia. Preferiblemente, la afinidad de unión al antígeno no se reduce en más de un 20%, preferiblemente no más de 15%, no más de 10% o no más de 5%. Además, de acuerdo con una forma de realización, la vida media en circulación del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo es al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% más baja que la vida media en circulación del anticuerpo de referencia. Como se discutió anteriormente, la disminución de la vida media en circulación se observa en al menos una especie, preferiblemente en un primate, más preferiblemente en un humano.

35 Los detalles con respecto al sitio de glicosilación de Fab han sido descritos anteriormente, mencionados en la descripción anterior. Los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo son preferiblemente sitios de N-glicosilación, en particular, que tienen la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido preferiblemente excepto Pro.

40 En realizaciones preferidas, al menos uno, preferiblemente todos los sitios de glicosilación adicionales en la parte Fab del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo están en la región variable de cadena pesada o cadena ligera, preferiblemente, la región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo difiere de la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia en al menos un aminoácido de modo que se introducen al menos sitios de glicosilación adicionales en la región variable de cadena pesada o cadena ligera. En realizaciones adicionales, al menos uno, preferiblemente todos los sitios adicionales de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo están en la región constante de cadena pesada o de cadena ligera, preferiblemente en la región constante de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada o de cadena ligera del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo difiere de la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia en al menos un aminoácido de modo que el al menos se introducen sitios de glicosilación adicionales en la región constante de cadena pesada o de cadena ligera.

5 El sitio de glicosilación en el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se puede introducir mediante cualquier método conocido en la técnica y, en particular, mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. También se han descrito anteriormente las opciones, mencionadas en la descripción anterior. Preferiblemente, se introduce el sitio de glicosilación mediante la adición, sustitución y/o supresión de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia. En particular, se alteran los aminoácidos de manera que se forma un sitio funcional de glicosilación que comprende un aminoácido que actúa como aceptor de la cadena de hidratos de carbono y/o que comprende una secuencia de reconocimiento de una enzima responsable de la glicosilación del anticuerpo, en particular, oligosacariltransferasa. En particular, para la introducción de un sitio de N-glicosilación, se altera la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia de modo que un sitio de glicosilación que tiene el motivo de la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier residuo de aminoácido preferiblemente excepto Pro, está presente en el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo.

15 Se describe una composición del anticuerpo que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos como se describió anteriormente que, en comparación con el anticuerpo de referencia correspondiente, comprender al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab. Se hace referencia a la descripción anterior para los detalles del anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo. La composición del anticuerpo puede tener cualquiera de las características descritas en este documento con respecto a las composiciones de anticuerpos descritas anteriormente. En particular, los anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos en la composición pueden tener un patrón de glicosilación en la parte Fc y/o la parte Fab como se definió y describió anteriormente.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo tienen una menor vida media en circulación que el anticuerpo de referencia. En estas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos tienen preferiblemente un bajo grado de sialilación y/o un alto grado de unidades de galactosa libre en la parte Fab, en particular una cantidad de ácidos siálicos y/o una cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab como se describió anteriormente con respecto a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que tienen una disminución de la vida media en circulación, es decir, obtenida después de la etapa (b1) o (b2) del método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo de acuerdo con la invención. Se hace referencia a la descripción anterior que igualmente también aplica aquí. En particular, en la composición menos de 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos un residuo de ácido siálico. Preferiblemente, en la composición menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 7%, menos de 5%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1% o aproximadamente 0% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación presentes en la parte Fab comprenden uno o más residuos de ácido siálico. Además, preferiblemente en la composición al menos 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libre. Preferiblemente, en la composición al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o más preferiblemente al menos 98% de los hidratos de carbono unidos a los uno o más sitios de glicosilación en la parte Fab comprenden al menos una unidad de galactosa libre, preferiblemente al menos dos unidades de galactosa libres.

40 Un método para producir un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una disminución de la vida media en circulación, puede comprender las etapas de:

(a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo (anticuerpo de referencia); y

45 (b) introducir una mutación en el ácido nucleico de manera que al menos se introduce un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab del anticuerpo codificado o un fragmento funcional o derivado del mismo.

50 De este modo, se obtiene un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo original (en este documento también denominado como anticuerpo de referencia), pero que tiene una disminución de la vida media en circulación. Como se discutió anteriormente, la disminución de la vida media en circulación se observa preferiblemente en al menos una especie, preferiblemente en un primate, lo más preferido en un ser humano. Más arriba se describen detalles con respecto a los anticuerpos de referencia adecuados y preferidos y las características de glicosilación adecuadas del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo; se hace referencia a la descripción anterior. La afinidad de unión al antígeno del anticuerpo obtenido o fragmento funcional o derivado del mismo preferiblemente es similar a o mayor que la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia. Preferiblemente, la afinidad de unión al antígeno no se reduce en más de un 20%, preferiblemente no más de 15%, no más de 10% o no más de 5%. Además, de acuerdo con una forma de realización, la vida media en circulación del anticuerpo obtenido o fragmento funcional o derivado del mismo es al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% más baja que la vida media en circulación del anticuerpo de referencia. Como se discutió anteriormente, la disminución de la vida media en circulación se observa en al menos una especie, preferiblemente en un primate, más preferiblemente en un humano.

Los métodos adecuados para la introducción de un sitio de glicosilación en la parte Fab han sido descrito anteriormente; se hace referencia a la respectiva divulgación.

Un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una disminución de la vida media en circulación, puede comprender las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o un derivado del mismo (anticuerpo de referencia);
- (b) introducir una mutación en el ácido nucleico de manera que se introduce al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab del anticuerpo codificado o un fragmento funcional o derivado del mismo;
- 10 (c) expresar el ácido nucleico obtenido en la etapa (b) en una célula huésped para producir un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab y que tiene una vida media en circulación más baja que el anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que no tiene dicho al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab.

15 El anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo se puede obtener, por ejemplo, a partir del medio de cultivo que comprende las células huésped. Las células huésped adecuadas para expresar anticuerpos son conocidas en la técnica y también se han descrito anteriormente. Las células huésped preferidas particulares tienen una baja o ninguna actividad de sialilación. Preferiblemente, se purifica el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo. Detalles con respecto al anticuerpo de referencia y el anticuerpo mutado obtenido que comprende al menos un sitio de glicosilación adicional en la parte Fab han sido descritos anteriormente; se hace referencia a la descripción anterior.

20 Además, se describen un ácido nucleico que puede ser obtenido a partir del método para producir un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una disminución de la vida media en circulación y un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que puede ser obtenido a partir del método para producción de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una disminución de la vida media en circulación.

Uso médico de los anticuerpos y las composiciones de anticuerpos

25 Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos descritas anteriormente y, en particular, el anticuerpo anti-EGFR y composiciones de anticuerpos anti-MUC1 descritos anteriormente son particularmente ventajosos ya que comprenden anticuerpos que tienen patrones de glicosilación optimizados y por lo tanto tienen una mayor vida media, un aumento de la actividad de ADCC y una alta compatibilidad con el sistema inmunológico humano. En particular, el anticuerpo anti-EGFR en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la invención que comprende un anticuerpo anti-EGFR 30 quimérico o humanizado tiene una mayor vida media en circulación y una mayor actividad de ADCC que el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Erbix). Además, en particular la ausencia de estructuras Galili reduce los efectos secundarios no deseados. Esta combinación de características ventajosas, además, permite la reducción de la dosis de anticuerpo necesaria para el tratamiento eficaz disminuyendo también de ese modo el riesgo de efectos secundarios no deseados. Además, los espectros del paciente se amplían por el patrón de glicosilación 35 optimizado y por lo tanto permite el tratamiento de los pacientes de todos los tipos de receptores de FcγIII, incluidos los pacientes de los alotipos F/F y F/V. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones de anticuerpos y, en particular, composiciones de anticuerpos anti-EGFR con un mejor perfil terapéutico.

40 Las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas en medicina, en particular en el tratamiento, profilaxis, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de una enfermedad, en particular cáncer. Por lo tanto, la composición del anticuerpo es preferiblemente una composición farmacéutica. El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, en particular un cáncer como se describió anteriormente.

45 En realizaciones preferidas, la composición del anticuerpo comprende un anticuerpo anti-EGFR como se describe en este documento y es para uso en el tratamiento, profilaxis, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de un cáncer, en particular un cáncer que expresa EGFR. En estas realizaciones, el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, carcinoma de mama y carcinoma de mama triplemente negativo. La composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-EGFR se puede utilizar en la terapia del cáncer junto con otro agente, en particular un agente quimioterapéutico tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, irinotecano, y/o en combinación con terapia de radiación. 50 Además, se puede utilizar después de una terapia contra el cáncer anterior, como terapia con irinotecano, terapia a base de platino o radioterapia.

En otras realizaciones preferidas, la composición del anticuerpo comprende un anticuerpo anti-Muc1 como se describe en este documento y es para uso en el tratamiento, profilaxis, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de un cáncer, en

5 particular un cáncer que expresa MUC1, en particular el antígeno tumoral TA-MUC1. En estas realizaciones, el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón y cáncer urotelial. La composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-MUC1 se puede utilizar en la terapia del cáncer junto con otro agente, en particular un agente quimioterapéutico tal como se describe aquí, y/o en combinación con terapia de radiación. Además, se puede utilizar después de una terapia contra el cáncer anterior, tal como quimioterapia o radioterapia.

10 Las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención, en particular, las composiciones de anticuerpos en donde al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferible al menos 95% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición no comprenden un residuo de fucosa, se pueden utilizar en el tratamiento de cáncer en pacientes que tienen al menos un alelo que codifica para FcγRIIIa-158F. Debido al bajo contenido de fucosa en la glicosilación de Fc, en particular, aumenta la actividad de ADCC de los anticuerpos en los pacientes que tienen al menos un alelo que codifica para FcγRIIIa-158F y, especialmente, es similar a aquella en pacientes que son homocigotos para el gen FcγRIIIa-158V. Esta característica ventajosa en combinación con una mejor vida media lograda mediante el aumento de la cantidad de ácido siálico en la parte Fab o mediante la eliminación de uno o, preferiblemente, todos los sitios de glicosilación en la parte Fab como se describe en el presente documento proporciona anticuerpos con un perfil clínico mejorado.

20 Por ejemplo, el tratamiento de un paciente con cáncer puede incluir y/o traducir en la reducción del tamaño del tumor, la eliminación de las células malignas, la prevención de la metástasis, la prevención de la recaída en un paciente que ha sido puesto en remisión, reducción, muerte parcial o completa de un cáncer diseminado, en células tumorales particulares o cáncer que hace metástasis, en particular células que incluyen aquellas en circulación o aquellas durante la evasión o invasión, una prolongación de la supervivencia y/o una prolongación del tiempo del tumor, respectivamente, la progresión del cáncer. El anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de cáncer pueden estar en la forma de un anticuerpo libre o fragmento o derivado o pueden estar acoplados a una sustancia adicional, por ejemplo un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido o un agente citotóxico o un marcador tal como un radionúclido o un marcador de fluorescencia. Además, la composición del antígeno puede comprender además uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales tales como agentes quimioterapéuticos. El agente adicional es preferiblemente un agente citotóxico o un radionúclido, en particular agentes de alquilación, tales como cisplatino, antimetabolitos, alcaloides de plantas y terpenoides, alcaloides de la vinca, podofilotoxina, taxanos tales como taxol, inhibidores de la topoisomerasa tales como irinotecano y topotecano, o antineoplásicos tales como doxorubicina. Para el uso en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de una enfermedad, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la invención preferiblemente está acoplado a un agente de marcación que es capaz de producir una señal detectable. En particular, dicho agente de marcación puede ser un radionúclido, un fluoróforo o una enzima.

35 Con respecto a las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención que comprende un anticuerpo anti-EGFR que tiene una mayor actividad de ADCC, dicho perfil clínico mejorado también incluye la expansión del grupo de pacientes que pueden ser tratados por la composición del anticuerpo. El tratamiento común de los pacientes con cáncer usando anticuerpos anti-EGFR, en particular, los anticuerpos anti-EGFR divulgados en los documentos WO 96/40210 o US 4.943.533, se basan en la capacidad del anticuerpo para inhibir la señalización intracelular de EGFR mediante la unión a y el bloqueo del sitio de unión del ligando del receptor. Ya que la ruta de señalización secuencia abajo de EGFR se traduce en proliferación celular, el bloqueo de la señalización de EGFR reduce la proliferación celular y, por tanto, el crecimiento del tumor. Sin embargo, este modo de acción no funciona para las células tumorales en donde dicha ruta de transducción de señales se activa continuamente, independientemente del estado de activación del EGFR. Esto puede ocurrir, por ejemplo, en el caso de mutaciones constitutivamente activas de uno o más miembros de la ruta de transducción de la señal, en particular un mutante K-Ras constitutivamente activa. Además, este modo de acción tampoco funciona con células tumorales que proliferan independiente de la ruta de transducción de señales de EGFR.

50 En contraste con los anticuerpos anti-EGFR comúnmente utilizados, la composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende anticuerpos anti-EGFR que tienen una mejor vida media en circulación y/o una mayor actividad de ADCC son capaces de matar cualquiera de las células tumorales que expresan EGFR, en particular las células tumorales que tienen una alta tasa de expresión de EGFR tales como aquellas en las que la expresión de EGFR se incrementa en comparación con el tejido normal. Por lo tanto, dicha composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que no solamente inhibe la proliferación de células tumorales objetivo, sino que mata las células tumorales objetivo, y que los anticuerpos anti-EGFR son eficaces contra las células tumorales, independientemente del estado de activación de la ruta de transducción de señales de EGFR. En particular, la actividad terapéutica de estos anticuerpos anti-EGFR es más independiente de la actividad de los elementos secuencia abajo de la ruta de transducción de la señal de EGFR, especialmente mutantes K-Ras constitutivamente activos. Por lo tanto, usando la composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende anticuerpos anti-EGFR que tiene una mayor actividad de ADCC como se ha descrito anteriormente, se expande el grupo de pacientes se pueden ser tratados a aquellos pacientes que tienen células tumorales o cancerosas que no se pueden tratar mediante el bloqueo de la unión del ligando a EGFR. En particular, esto incluye tumores o células cancerosas que comprenden una

mutación activadora o sobreexpresión en la ruta de transducción de señales de EGFR tal como un mutante K-Ras constitutivamente activo, un mutante PI 3 quinasa constitutivamente activo o una sobreexpresión de Raf quinasa. Ejemplos de los mutantes K-Ras respectivos son K-Ras que tiene una mutación en el aminoácido número 12, tal como K-Ras G12V, K-Ras G12D, K-Ras G12C, K-Ras G12S, K-Ras G12A y K-Ras G12R, K-Ras que tiene una mutación en el aminoácido número 13, tal como K-Ras G13D y K-Ras G13R, y K-Ras que tiene una mutación en el aminoácido número 61, tal como K-Ras Q61H, K-Ras Q61K, y K-Ras Q61L. Los mutantes respectivos PI 3 quinasa en particular incluyen PI 3 quinasa que tienen una mutación activadora en la subunidad catalítica PI 3 quinasa clase I, p110 α . Además, tampoco los pacientes en los que el tumor no es causado por una desregulación de la ruta de transducción de la señal de EGFR pueden ser tratados por la presente composición del anticuerpo, con tal que las células tumorales expresen EGFR. Preferiblemente, la composición del anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende anticuerpos anti-EGFR se utiliza en el tratamiento de cáncer colorrectal o cáncer de cabeza y cuello, en particular cáncer colorrectal metastásico o cáncer de cabeza y cuello. Preferiblemente, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo anti-EGFR como se describió anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, de diluyentes, que se definen como vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o humanos. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, agua tamponada, solución salina fisiológica, PBS, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, excipientes y similares. Las composiciones también pueden incluir sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para regular y ajustar el pH, agentes para ajustar la toxicidad, agentes humectantes y detergentes.

La composición también puede incluir cualquiera de una variedad de agentes estabilizantes, tales como un antioxidante, por ejemplo. Cuando la composición farmacéutica incluye un polipéptido, el polipéptido puede formar un complejo con diversos compuestos conocidos que mejoran la estabilidad in vivo del polipéptido, o bien mejoran sus propiedades farmacológicas (por ejemplo, aumentan la vida media del polipéptido, reducen su toxicidad, aumentan la solubilidad o la absorción). Ejemplos de tales agentes modificadores o complejantes incluyen sulfato, gluconato, citrato y fosfato. Los polipéptidos de una composición también pueden formar complejos con moléculas que mejoran sus atributos in vivo. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso), y lípidos.

Otra orientación con respecto a las formulaciones que son adecuadas para diferentes tipos de administración puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar en una variedad de formas diferentes. Los ejemplos incluyen la administración de una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable por vía oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal, y métodos intracraneales.

El método para producir la composición del anticuerpo

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una vida media en circulación deseada, que comprende la etapa de expresar dicho anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo en una célula huésped, en donde el método para controlar la vida media del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención se realiza utilizando la etapa (a1), la etapa (a2), la etapa (b1) o la etapa (b2) de dicho método.

Preferiblemente, la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo y acumula la composición del anticuerpo en dicho medio de cultivo y se recupera la composición del anticuerpo del medio de cultivo celular.

Los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos en la composición del anticuerpo pueden tener una o más de las funciones descritas en el presente documento. Además, los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos se expresan preferiblemente en una línea celular que es capaz de producir las características deseadas de glicosilación y/o necesarias para el control de la vida media de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos. En particular, las células y líneas celulares como se describe aquí se pueden utilizar para expresar los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos. Preferiblemente, se usan células humanas o líneas celulares, en particular líneas celulares humanas inmortalizadas, tales como líneas celulares de sangre humana, preferiblemente líneas celulares mieloides humanas o líneas celulares de leucemia mieloide humana.

Para la producción de composiciones de anticuerpos que comprenden anticuerpos que tienen una mayor vida media en

5 circulación, los anticuerpos se expresan preferiblemente en una línea celular que tiene una alta actividad de sialilación. Un ejemplo de tal línea celular es la línea celular humana GT-5s o una línea celular derivada de la misma o una línea celular homóloga a la misma, preferiblemente como se definió anteriormente. Las composiciones de anticuerpos que comprenden anticuerpos que tienen una mayor vida media en circulación y una mejor actividad de ADCC pueden obtenerse mediante la expresión de los anticuerpos en una célula o línea celular que tiene una alta actividad de sialilación y una baja actividad de fucosilación. Por ejemplo, se pueden utilizar líneas celulares derivadas de GT-5s que tienen una menor actividad de fucosilación tal como aquellas descritas anteriormente.

Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención que se pueden tener por referencia a la especificación como un todo.

10 Figuras

La Figura 1 muestra la unión del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (Cetuximab SP2/0) en diferentes líneas celulares analizadas por citometría de flujo. Se muestran los valores medios de los duplicados \pm DE.

La Figura 2 muestra la farmacocinética de Pankomab expresada en células GT-5s o células NM-F9 en ratas.

15 La Figura 3 muestra la farmacocinética de Cetuximab expresada en células Fuc⁻ derivadas de GT-5s o células SP2/0 en monos cynomolgus.

La Figura 4 muestra la farmacocinética de Cetuximab quimérico que tienen un sitio de glicosilación de Fab y Fc y Cetuximab humanizado únicamente tiene un sitio de glicosilación de Fc, expresado en células Fuc⁻ derivadas de GT-5s.

20 La Figura 5 muestra la actividad inhibidora de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cet. invent.) y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cet. SP2/0) sobre los receptores de EGF. A: La inhibición de la fosforilación de EGFR mediante la prevención de la unión del ligando en presencia de las diferentes variantes de Cetuximab. Se determinó la cantidad de EGFR total y EGFR fosforilado en lisados celulares usando un kit disponible en el mercado. Se presenta el porcentaje de EGFR fosforilado en EGFR total. Se muestran los valores medios de los duplicados \pm DE. B: La inhibición de la proliferación de células A431 mediante la prevención de la unión del ligando a EGFR en presencia de las diferentes variantes de Cetuximab. Se muestran los valores medios de 6 pozos \pm DE.

25 La Figura 6 muestra un ensayo de apoptosis de la caspasa-3 activa utilizando células A431 después de la incubación durante 18 h con Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cet. de la invención) y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cetux. SP2/0) y proteína G. Se muestran los valores medios del porcentaje de células positivas para caspasa-3 (células apoptóticas) \pm DE de las mediciones por duplicado.

30 La Figura 7 muestra la lisis de células objetivo por ADCC usando Cetuximab expresado en diferentes líneas celulares.

La Figura 8 muestra la lisis de células objetivo por las PBMC obtenidas de un donante Fc γ RIIIa-158V homocigótico usando Cetuximab expresado en una línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s o en células SP2/0.

La Figura 9 muestra la lisis de células objetivo por las PBMC obtenidas de un donante Fc γ RIIIa-158F heterocigotos usando Cetuximab expresado en una línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s o en células SP2/0.

35 La Figura 10 muestra la lisis de células objetivo por las PBMC obtenidas de un donante Fc γ RIIIa-158F homocigótico usando Cetuximab expresado en una línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s o en células SP2/0.

40 La Figura 11 muestra un ensayo de ADCC en células LS174T con PBMC primaria humana de donantes con diferentes alotipos de Fc γ RIIIa (tiempo de incubación 5 h, relación de E:T de 80:1, todos los análisis realizados en el mismo día en paralelo). Se proporcionan los valores medios de lisis específica - lisis específica sin anticuerpo (BG) y la desviación estándar por triplicado. A: Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención; B: Cetuximab expresado en células SP2/0.

45 La Figura 12 muestra una comparación de las actividades de ADCC de Pankomab expresado en diferentes células. Ensayo de liberación de europio con ZR-75-1 y las PBMC humanas en una relación de E:T de 50:1 después de la incubación con Pankomab a partir de células CHO (Pankomab CHO), células mieloides humanas deficientes en sialilación (Pankomab sialil. -, sialiladas moderadamente) o células GT-5s (Pankomab sial. +, muy sialiladas) a diferentes concentraciones durante la noche.

La Figura 13 muestra la lisis de células objetivo por las PBMC obtenidas de un donante Fc γ RIIIa-158F homocigótico usando Pankomab expresado en células GT-5s o en una línea celular Fuc⁻ derivada GT-5s.

- La Figura 14 muestra la lisis de células objetivo que comprenden una mutación K-Ras constitutivamente activa por las PBMC obtenidas de donantes FcγRIIIa-158V homocigotos o donantes FcγRIIIa-158F homocigotos usando Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención.
- 5 La Figura 15 muestra la cantidad de glicanos sialilados en combinaciones de isotipos de carga diferente. (A) muestra la sialilación de las partes Fc y Fab en las combinaciones obtenidas de cromatoenfoque (combinación 1: pH alto, combinación 2: pH medio, combinación 3: pH bajo). (B) muestra la sialilación de las combinaciones utilizadas para los estudios farmacocinéticos (Cetuximab A: combinaciones 1 y 2; Cetuximab B: combinación 3). S1 significa glicano que porta solo ácido siálico, S2 significa glicano disialilado y S > 0 significa la suma de S1 y S2.
- La Figura 16 muestra la farmacocinética de vida media en circulación de Cetuximab en ratones.
- 10 Cetuximab A: baja sialilación; Cetuximab B: alta sialilación. La concentración de anticuerpo está en escala logarítmica.
- La Figura 17 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cetuximab SP2/0) en ratones desnudos portadores del xenoinjerto de carcinoma de vulva epidermoide humana A431. Los ratones xenoinjertados fueron tratados en el nivel de dosificación indicada cuando los tumores alcanzaron un tamaño palpable. Cada símbolo representa el valor medio y SEM de un grupo de 8 animales. #: Debido al tamaño crítico del tumor, los animales del grupo de control fueron sacrificados el día 20.
- 15 La Figura 18 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) en ratones desnudos portadores del xenoinjerto de carcinoma de colon DU145. Ratones desnudos xenoinjertados fueron tratados con Cetuximab (invención) con el nivel de dosificación indicado después de que los tumores alcanzaron un tamaño palpable. Cada símbolo representa el valor medio y SEM de un grupo de 7-8 animales.
- 20 La Figura 19 muestra el efecto de Pankomab sialilado expresado en células GT-5s en el crecimiento tumoral en ratones desnudos xenoinjertados ZR-75-1. Grupos de 8 ratones, ratones desnudos, dosis: 0,5 mg/kg, administración i.v.. Pankomab sial. +: Pankomab sialilado; Pankomab sial. -: Pankomab no sialilado; PBS: regulador de control.
- La Figura 20 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invent.)) En ratones desnudos portadores de xenoinjertos derivados del paciente de origen NSCLC y CRC. Se trataron ratones desnudos xenoinjertados con regulador de control o diferentes concentraciones de Cetuximab (invent.) cuando los tumores alcanzaron un tamaño palpable. Cada símbolo representa el valor medio y SEM de un grupo de 8 animales.
- 25 La Figura 21 muestra dibujos esquemáticos de (A) un anticuerpo IgG y (B) la estructura central y (C) la estructura de tipo complejo biantenarico de las cadenas de hidratos de carbono que se unen a los sitios de glicosilación de Fab y Fc del anticuerpo. En (A), el anticuerpo IgG comprende ejemplos de estructuras de hidratos de carbono en los ejemplos de sitios de glicosilación. Sólo se muestra la glicosilación de una cadena pesada del anticuerpo. La otra cadena pesada comprende los sitios de glicosilación correspondientes que portan las estructuras correspondientes de hidratos de carbono, que no se muestran en el dibujo esquemático. En (B) y (C), un cuadrado negro representa un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc), un círculo gris representa un residuo de manosa (Man), un círculo blanco representa un residuo de galactosa (Gal), un rombo gris representa un residuo de ácido siálico (SA), un triángulo negro representa un residuo de fucosa (Fuc) y un cuadrado gris representa un residuo de N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc). En la estructura de tipo complejo biantenarico, GlcNAc, Gal y SA en las ramificaciones de los hidratos de carbono, bisGlcNAc así como Fuc solamente están opcionalmente presentes en la estructura de hidratos de carbono y también pueden estar ausentes.
- 30 Los valores porcentuales indicados en este documento para ciertas propiedades de glicosilación en particular significa que de todos los hidratos de carbono en una composición, el porcentaje indicado tiene la propiedad descrita. Si el valor porcentual se refiere solamente a un grupo específico de hidratos de carbono, por ejemplo los hidratos de carbono unidos al sitio de glicosilación en la parte Fab del anticuerpo en una composición, entonces significa que de todos los hidratos de carbono unidos al sitio de glicosilación en la parte Fab de los anticuerpos en la composición, el porcentaje indicado tiene la propiedad descrita. Tales propiedades de glicosilación se pueden determinar, por ejemplo, mediante la escisión de los anticuerpos en la composición en sus partes Fab y Fc, la separación de las partes Fab de las partes Fc, la escisión de los hidratos de carbono de las partes Fab y Fc separadas, y la determinación de las estructuras y/o las propiedades de los hidratos de carbono (separadamente para los hidratos de carbono de la parte Fab y los hidratos de carbono de la parte Fc). Los métodos de medición adecuados para determinar las estructuras y propiedades son, por ejemplo, métodos de HPLC y espectroscopía de masas.
- 35 40 45 50

Ejemplos

Ejemplo 1: Glicoperfilación

anticuerpos anti-EGFR

5 Para caracterizar el patrón de glicosilación del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab expresado en una línea celular Fuc⁻ que se derivó de la línea celular de sangre inmortalizada humana GT-5s (Fuc⁺) o en la línea celular de ratón SP2/0 (Erbix) se realizaron estudios más detallados de glicoperfilación. El anticuerpo IgG quimérico humano/ratón Cetuximab comprende un sitio de N-glicosilación en la región marco 3 de la región variable de cadena pesada y un sitio de N-glicosilación en la región constante de cadena pesada 2.

10 Los anticuerpos se escindieron con papaína que resulta en la generación de un fragmento Fc y dos fragmentos Fab. La separación de los fragmentos se realizó empleando cromatografía de afinidad en una fase sólida de proteína A que se une a fragmentos Fc, pero no a los fragmentos Fab. Después de la separación de la parte Fc de la parte Fab, se aplicaron los N-glicanos de cada fragmento para la glicoperfilación.

Para la glicoperfilación, se liberaron los N-glicanos intactos del núcleo de la proteína y se marcaron los extremos reductores de N-glicanos con un marcador de fluorescencia. La muestra purificada de los N-glicanos marcados se separó por HPLC.

15 Se emplearon las áreas de los picos con base en la detección fluorométrica para el cálculo de las abundancias molares relativas de las estructuras de N-glucono. Los datos estimados para ambos anticuerpos se resumen en la Tabla 1. Los valores representan los contenidos molares relativos de N-glicanos que contienen el tipo interesante de monosacárido (por ejemplo, fucosa).

Tabla 1

Muestra	Abundancia relativa [% en moles]*									
	F	S0	S>0	S1	S2	G0	G1	G2	B	Galili
Cetuximab										
Fuc ⁻ Fc	8	95	4	4	0	20	48	31	23	0
Fuc ⁻ Fab	40	15	78	65	13	1	8	85	71	0
SP2/0 Fc	98	100	0	0	0	55	38	6	3	0
SP2/0 Fab	78	43	37	30	7	2	2	75	6	56

* Las abundancias relativas de las estructuras de glicano están relacionadas con la cantidad total de N-glicanos. Dado que no todas las estructuras de glicano podían ser asignadas, la suma de las abundancias relativas de las estructuras de glicano sialiladas y no sialiladas o galactosiladas y no galactosiladas no da 100% en cada caso.

20 F = N-glicanos fucosilados; S0 = N-glicanos no sialilados; S> 0 = N-glicanos sialilados; S1 = N-glicanos monosialilados; S2 = N-glicanos disialilados; G0 = N-glicanos no galactosilados, G1 = N-glicanos monogalactosilados, y G2 = N-glicanos digalactosilados, B = N-acetilglucosamina bisectante, Galili = Gal-1,3-Gal.

25 La glicoperfilación muestra que los anticuerpos Cetuximab expresados en células Fuc⁻ derivadas de GT-5s tienen un contenido de fucosa promedio mucho más bajo en la glicosilación de Fc, un mayor contenido promedio de ácido siálico en la glicosilación de Fab y un contenido promedio mayor de bisGlcNAc en la Fc, así como la glicosilación de Fab en comparación con anticuerpos Cetuximab expresados en células SP2/0 de ratón. Además, sólo los anticuerpos Cetuximab expresados en células SP2/0 comprenden el epítipo Galili que es responsable por los efectos secundarios adversos en los seres humanos.

30 Además, se determinaron las cantidades relativas de NeuGc y NeuAc en las dos preparaciones diferentes de Cetuximab. El ácido 5-N-glicolilneuramínico inmunogénico (NeuGc) puede distinguirse del ácido 5-N-acetilneuramínico (NeuAc) por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC).

35 Para el análisis, se liberaron los ácidos siálicos de las proteínas. Se marcaron los ácidos siálicos libres con un fluoróforo y se analizaron por medio de RP-HPLC empleando detección fluorométrica. NeuAc y NeuGc marcados difieren en los tiempos de retención en RP-HPLC. Se usaron estándares comercialmente disponibles para la identificación de estos compuestos.

La Tabla 2 resume los resultados. Para Cetuximab expresado en SP2/0, se identificaron ambos ácidos siálicos, con un alto predominio del ácido 5-N-glicolilneuramínico (96%) sobre el ácido 5-N-acetilneuramínico (4%). Por el contrario, sólo se pudo detectar el ácido 5-N-acetilneuramínico para Cetuximab de acuerdo con la presente invención expresado en la línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s humana.

Tabla 2

Muestra	Cantidad molar relativa [% en moles]	
	NeuAc	NeuGc
Fuc ⁻	100	0
SP2/0	4	96

En los siguientes experimentos, se usó Cetuximab expresado en células GT-5s o en una línea celular Fuc⁻ derivada de células GT-5s como un ejemplo de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención que tiene un patrón de glicosilación mejorado, en particular, un alto grado de sialilación en la parte Fab, una alta cantidad de GlcNAc bisectante y opcionalmente una baja cantidad de fucosa en la parte Fc. Se utilizó Cetuximab expresado en células SP2/0 (Erbix) como control negativo, ya que muestra una sialilación significativamente menor en la parte Fab.

anticuerpos anti-MUC1

Se realizó una glicoperfilación similar con el anticuerpo TA-Muc-1 Pankomab expresado en GT-5s y en una línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s. Se utilizó una versión humanizada del anticuerpo IgG Pankomab (hPM) que tiene un sitio de N-glicosilación en la CDR2 de la región variable de cadena pesada y un sitio de N-glicosilación en la región constante de cadena pesada 2.

Tabla 3

Muestra	F	S	G	B
hPM (GT-5s)	84	38	81	n.d.
hPM Fab (GT-5s)	78	71	93	n.d.
hPM Fc (GT-5s)	86	3	70	n.d.
hPM (Fuc ⁻)	31	37	82	28

F = N-glicanos fucosilados; S = N-glicanos sialilados; G = N-glicanos galactosilados; B = N-acetilglucosamina bisectante; n.d. = no determinado

La línea celular Fuc⁻ derivada de la línea celular GT-5s produce anticuerpos Pankomab que tienen un patrón de sialilación y un patrón de galactosilación muy similares, mientras que la cantidad de fucosa se reduce notablemente. La cantidad promedio baja de hidratos de carbono fucosilados en todos los anticuerpos Pankomab expresados por Fuc⁻ indica una cantidad promedio aún más baja de glicosilaciones de Fc que portan fucosa. La cantidad de residuos de GlcNAc bisectantes no se determinó en el glicoanálisis realizado con Pankomab humanizado obtenido de células GT-5s.

Se realizó un glicoanálisis adicional del anticuerpo Pankomab expresado en GT-5s, utilizando procedimientos de análisis y detección mejorados. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4

Muestra	Abundancia relativa [% en moles]*									
	F	S0	S > 0	S1	S2	G0	G1	G2	B	Galili
Pankomab Fc	83	84	6	5	1	27	44	20	26	0
Pankomab Fab	92	15	79	44	35	2	3	89	65	0

* Las abundancias relativas de las estructuras de glicano están relacionadas con la cantidad total de N-glicanos. Dado que no todas las estructuras de glicano podían ser asignadas, la suma de las abundancias relativas de las estructuras de glicano sialiladas y no sialiladas o galactosiladas y no galactosiladas no da 100% en cada caso.

F = N-glicanos fucosilados; S0 = N-glicanos no sialilados; S > 0 = N-glicanos sialilados; S1 = N-glicanos monosialilados; S2 = N-glicanos disialilados; G0 = N-glicanos no galactosilados, G1 = N-glicanos monogalactosilados, y G2 = N-glicanos digalactosilados, B = N-acetilglucosamina bisectante, Galili = Gal-1,3-Gal.

Ejemplo 2: estudios de unión a antígeno

ELISA del antígeno

5 Se desarrolló un ELISA específico del antígeno (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) para el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab con el antígeno EGFR comercialmente disponible inmovilizado en placas de 96 pozos Maxisorp. Se bloquearon los pozos recubiertos con BSA al 2% en PBS para evitar la unión no específica de anticuerpos. Los anticuerpos anti-EGFR, diluidos en BSA/PBS al 1%, se incubaron con el antígeno inmovilizado para la unión y detección mediante un anticuerpo anti-IgG humano secundario marcado con enzima. La enzima POD convierte el sustrato TMB en un colorante, que se cuantificó fotométricamente después de la acidificación con ácido sulfúrico diluido a 450 nm.

10 Se utilizó Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Erbix (Merck)) para la calibración en el rango de 1 a 10 ng/ml. Las muestras que comprenden Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención se diluyeron hasta 4 y 8 ng/ml y se compararon con la curva de calibración (ecuación cuadrática ajustada). Los resultados de diferentes sondas de Cetuximab muestran que la unión de ambos anticuerpos en el ELISA es comparable.

15 Cinética y afinidad (Resonancia de Plasmón de Superficie)

20 Se recubrió covalentemente un chip sensor CM5 por acoplamiento de aminas con el dominio extracelular de EGFR disponible en el mercado. Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (Erbix; que tiene un grado de sialilación bajo) y dos preparaciones de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención corrió simultáneamente sobre dos celdas de flujo, recubiertas con diferentes densidades de ligando, dando como resultado un $R_{máx}$ de aproximadamente 25 y 100 RU, respectivamente. Los anticuerpos anti-EGFR se inyectaron en una amplia gama de concentraciones (2 nM a 1 μ M) para calcular la cinética de unión. Puesto que un anticuerpo tiene dos sitios de unión, se utilizó un modelo de evaluación bivalente. Los resultados se muestran en la Tabla 5. La constante de asociación k_{a1} y la constante de disociación k_{d1} son las constantes relevantes como pueden mostrarse en el software de simulación de Biacore BIASimulation 2.1. Por lo tanto se utilizaron estas dos constantes para calcular una constante de afinidad K_D . Tomando los resultados de todos los experimentos con las celdas de flujo poco recubiertas y ligeramente más recubiertas, las K_D para ambas variantes de Cetuximab son comparables con la K_D de la variante de Cetuximab de acuerdo con la invención que es incluso un poco mejor (un valor de K_D menor indica una unión más fuerte al antígeno).

Tabla 5

	Cetuximab (invención)	Erbix
k_{a1} [1/MS]	3,73e5	3,29e5
k_{d1} [1/s]	3,35e-3	4,21e-3
k_{a2} [1/RUs]	0,527	1,28
k_{d2} [1/s]	0,298	0,536

$K_D = k_d / k_a$ [nM]	9	13
------------------------	---	----

Unión de células tumorales en citometría de flujo

5 Se analizaron diversas líneas celulares positivas para el receptor de EGF por citometría de flujo para investigar y comparar las propiedades de unión del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención y Cetuximab que tiene un bajo grado de sialilación (expresado en células SP2/0 de ratón). Brevemente, se recogieron las células objetivo y se incubaron con el anticuerpo anti-EGFR en diferentes concentraciones. Se lavaron las células y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG humano conjugado con Cy3 secundario a 4°C en la oscuridad. Se lavaron las células de nuevo y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson). Las células vivas fueron seleccionadas con base en sus propiedades de dispersión y se calculó el porcentaje de células positivas utilizando el software FACSDiva (Becton Dickinson).

10 Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón muestran características de unión comparables en todas las líneas celulares tumorales ensayadas, como se muestra en la Figura 1.

Análisis de Scatchard

15 Dos factores son particularmente importantes para la idoneidad terapéutica de un anticuerpo: la afinidad y el número de sitios de unión para un anticuerpo en las células tumorales.

20 La afinidad de unión de un receptor-ligando describe la fuerza de su interacción. En el caso de las interacciones antígeno-anticuerpo se definen por el equilibrio químico de anticuerpos/antígenos libres y el complejo antígeno-anticuerpo formado. Este equilibrio es también la relación de la constante de asociación y la constante de disociación y está influenciada por diferentes parámetros, como por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals. El análisis de Scatchard se utiliza comúnmente para el cálculo de la constante de afinidad de unión del ligando-receptor. La ecuación de Scatchard está dada por

$$\frac{r}{c} = nK_a - rK_a$$

25 donde r es la relación de la concentración de ligando unido al total de sitios de unión disponibles, c es la concentración de ligando libre, y n es el número de sitios de unión por molécula de proteína.

Si se asume una interacción monovalente y se grafican estos datos, r/c vs r, se obtiene un gráfico de Scatchard lineal con una pendiente -K_a y un intercepto y de nK_a. En el caso de los estudios de unión celular (donde células se refieren al antígeno), el número de anticuerpos unidos por célula se pueden calcular a partir del intercepto X.

30 Se evaluó la unión del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención y expresado en células SP2/0 de ratón a las líneas celulares tumorales usando anticuerpos marcados en forma radiactiva en estudios de unión a las células. Se quelaron los anticuerpos con p-SCN-Bencil-DTPA y se marcaron en forma radiactiva con ¹¹¹In libre de portador. La constante de disociación y los sitios de unión al anticuerpo se estimaron mediante el análisis gráfico de Scatchard.

35 Los experimentos de unión se realizaron con ambos anticuerpos en condiciones comparables. Se utilizaron las líneas celulares tumorales humanas A431, LS174T y DU145 para investigar y comparar las propiedades de unión de ambos anticuerpos. Experimentalmente, se incubaron alícuotas de células (número igual por vial) con cantidades crecientes de las diferentes preparaciones de anticuerpos marcados en forma radiactiva con ¹¹¹In, se dejó equilibrar, y después de eso se separaron del anticuerpo no unido. La cantidad de anticuerpo unido a la célula se determinó por medición de la radiactividad y se evaluaron los datos como se describió anteriormente.

40 Como resultado, se estimaron afinidades comparables y el número de sitios de unión mediante el análisis gráfico de Scatchard. La Tabla 6 resume los resultados de experimentos de unión de las células.

Tabla 6

Línea celular tumoral	Constante de disociación K _D [M]		Número de sitios de unión por célula	
	Cetuximab (inv.)	Cetuximab SP2/0	Cetuximab (inv.)	Cetuximab SP2/0

A431	$1,3 \times 10^{-9}$	$0,8 \times 10^{-9}$	$6,9 \times 10^{5*}$	$5,1 \times 10^5$
LS174T	$2,3 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
DU145	$0,9 \times 10^{-9}$	$0,4 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$

Los valores (para LS174T, DU145) representan una media de al menos dos conjuntos individuales de experimentos. El número de sitios de unión por célula se refiere al número de moléculas de anticuerpo unidas por célula y no al número de lugares de unión al receptor en las superficies celulares.

5 Los resultados muestran que la afinidad y el número de sitios de unión a Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (inv.)) y Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (Cetuximab SP2/0) hacia las células tumorales son comparables.

10 Se realizó un análisis de Scatchard similar para el anticuerpo anti-MUC1 Pankomab. Experimentos análogos fueron realizados con Pankomab expresado en células CHO y Pankomab expresado en células GT-5s, purificado cada uno mediante cromatografía sobre proteína A. Se utilizó la línea celular tumoral humana ZR-75-1 para investigar y comparar las propiedades de unión de los anticuerpos Pankomab (todos los anticuerpos IgG1 de misma especificidad) expresados en diferentes células.

15 Experimentalmente, se incubaron alícuotas de células (igual número por vial) con cantidades crecientes de las diferentes preparaciones de anticuerpos (se utilizó para la cuantificación Pankomab marcadas radioactivamente con ^{111}In), se dejó equilibrar, y después de eso se separó del anticuerpo no unido. Se determinó la cantidad de anticuerpo unido a las células por medición de la radiactividad y se evaluaron los datos como se describió anteriormente. La Tabla 7 resume los datos. Como resultado se midió una unión comparable para las variantes de Pankomab glicosiladas en forma diferente.

Tabla 7

Anticuerpo	Constante de disociación K_D [M]	Número de sitios de unión por célula
PankoMab expresado en CHO	$7,8 \times 10^{-9}$	$8,2 \times 10^5$
PankoMab expresado en GT-5s	$3,33 \times 10^{-9}$	$6,7 \times 10^5$

20

Resumen

En conclusión, los experimentos anteriores demuestran que el patrón de glicosilación mejorado de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, en particular, el mayor grado de sialilación en la parte Fab del anticuerpo, no influye negativamente en sus propiedades de unión al antígeno.

25 Ejemplo 3: Vida media en circulación de los anticuerpos glicosilados de manera diferente

Para probar la vida media en circulación de anticuerpos glicosilados de manera diferente, se realizó un ensayo farmacocinético.

30 Para este ensayo, se inyectaron 15 μg de anticuerpo Pankomab anti-TA-MUC1 purificado en proteína A en ratas y se determinó la cantidad de anticuerpo en el suero de la rata en puntos de tiempo específicos. Se comparó Pankomab expresado en células GT-5s con Pankomab expresado en la línea celular de sangre inmortalizada humana NM-F9 (DSM ACC2606 divulgada, por ejemplo, en el documento WO 2005/017130 A; Fuc⁺, ácido siálico). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se puede observar, los anticuerpos que tienen un alto grado de sialilación en la parte Fab (GT-5s) tienen una mucho mayor vida media en circulación que los anticuerpos que tienen un grado de sialilación bajo (NM-F9).

35 En un ensayo farmacocinético adicional, se analizó la vida media en circulación del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab expresado en una línea celular Fuc⁻ derivada de células GT-5s y expresado en células SP2/0 de ratón en un ensayo *in vivo* en mono cynomolgus. Los resultados se muestran en la Figura 3. Allí, se demostró nuevamente que los

anticuerpos que tienen un alto grado de sialilación en la parte Fab (línea celular Fuc⁻ derivada de GT-5s) tienen una vida media en circulación mucho mayor que los anticuerpos que tienen un grado de sialilación bajo (SP2/0):

Tabla 8

	C _{máx} [µg/mL]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-∞} [µg*h/mL]
Cetuximab (invención)	664 ± 53	110 ± 28	74600 ± 18400
Cetuximab (SP2/0)	589 ± 58	68 ± 7	46400 ± 2800

5 De este modo, mediante el aumento de la cantidad de ácido siálico en la glicosilación de Fab, se incrementó considerablemente la vida media en circulación.

10 En un tercer ensayo farmacocinético, se comparó la vida media en circulación del anticuerpo IgG humano/ratón quimérico Cetuximab que tiene un sitio de glicosilación en la parte Fab y un sitio de glicosilación en la parte Fc con la vida media en circulación de la versión humanizada de este anticuerpo en donde se removió el sitio de glicosilación en la parte Fab y que sólo comprende el sitio de glicosilación en la parte Fc. Ambos anticuerpos han sido expresados en una línea celular Fuc⁻ derivada de células GT-5s.

15 Se inyectaron 10 µg de anticuerpo/ratón en ratones y se detectó la cantidad relativa de anticuerpo recuperado después del tiempo indicado. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la Figura 4. Se demostró que el anticuerpo humanizado que no tiene un sitio de glicosilación de Fab tiene una vida media en circulación idéntica comparada con el anticuerpo quimérico que comprende hidratos de carbono altamente sialilados unidos a su sitio de glicosilación de Fab. Esto demuestra que también la eliminación del sitio de glicosilación de Fab resulta en un aumento de la vida media como se enseña en el presente documento.

20 En conclusión, los experimentos anteriores muestran que se puede aumentar la vida media en circulación de un anticuerpo que tiene una glicosilación de Fab con un bajo contenido de ácido siálico, ya sea aumentando la cantidad de ácido siálico en los hidratos de carbono unidos a la parte Fab o removiendo el sitio de glicosilación presente en la parte Fab.

Ejemplo 4: inhibición del receptor de EGF por anticuerpos anti-EGFR glicosilados en forma diferente

25 La activación del EGFR por ligandos nativos (por ejemplo, EGF o TNF alfa) conduce a la dimerización, estimulación y fosforilación del receptor del dominio quinasa intracelular. La cascada de señalización que se induce en el núcleo inducida de este modo activa la proliferación celular. Un mecanismo de acción del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab es la prevención de la fosforilación inducida por EGF del dominio quinasa intracelular del EGFR suprimiendo de ese modo la transducción de la señal en el núcleo. Esto resulta en una inhibición de la proliferación inducida por EGF de líneas celulares positivas para EGFR.

Inhibición de la fosforilación de EGFR

30 Con el fin de analizar los efectos de los anticuerpos Cetuximab glicosilados en forma diferente en la fosforilación de EGFR, se llevó a cabo un ensayo de fosforilación de EGFR. En resumen, se dejaron células A431 (línea celulares de carcinoma epidermoide humano de la vulva) o células LS174T (adenocarcinoma de colon epitelial humano) en inanición de EGF por el agotamiento del suero durante 24 horas. Se incubaron las células con diferentes concentraciones de diferentes versiones de Cetuximab (0,1 - 10 µg/ml) durante 4 horas y se estimularon con 0,1 µg/ml de EGF durante 15 min. Se prepararon lisados de las células y se determinó el contenido de EGFR total y EGFR fosforilado (p-EGFR) utilizando un kit de EGFR total/p-EGFR disponible comercialmente (Mesoscale Discoveries) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes, que permite la detección simultánea de EGFR y EGFR fosforilado dentro del mismo pozo. En el kit de EGFR total/p-EGFR, se recubrieron previamente las placas con un anticuerpo específico para EGFR fosforilado (Tyr1173) en un punto del pozo y un anticuerpo que reconoce EGFR fosforilado y no fosforilado (total) en otro punto del mismo pozo. Después del bloqueo y lavado, se incubaron las placas con los lisados, se lavaron las placas y se detectó EGFR unido con un anticuerpo secundario marcado con la etiqueta Sulfo. Se midió la electro quimioluminiscencia para cada punto por separado en un SectorImager SI6000 (Mesoscale Discoveries). Se calculó el porcentaje de la señal en el punto de pEGFR en comparación con la señal en el punto para EGFR total (mismo pozo).

45 La Figura 5A muestra los resultados de un ensayo de medición de la fosforilación de EGFR después de la estimulación de EGF de la línea celular A431 positiva para EGFR en ausencia y en presencia de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cetuximab SP2/0). Se

determinó una reducción dependiente de la concentración del porcentaje de EGFR fosforilado. Con 1 y 10 µg/ml de Cetuximab, hay sólo un tercio de la cantidad de EGFR fosforilado encontrado en comparación con aquella sin incubación del anticuerpo. La reducción de la fosforilación de EGFR fue comparable para ambas variantes de Cetuximab. Se obtuvieron resultados similares utilizando la línea celular LS174T positiva para EGFR. Como resultado, Cetuximab que tiene el patrón de glicosilación mejorado de acuerdo con la presente invención inhibe la fosforilación de EGFR del dominio quinasa intracelular en el mismo nivel que el Cetuximab disponible comercialmente (Erbix) bajo las condiciones utilizadas.

Inhibición de la proliferación

La unión de Cetuximab en el dominio extracelular del receptor de EGF se traduce en la inhibición de la unión al ligando, lo que reduce la proliferación dependiente de EGF de las células tumorales. Con el fin de analizar este mecanismo de acción para las variantes de Cetuximab glicosiladas de manera diferente, se midió la proliferación de células A431 (línea celular epidermoide humana de la vulva) en un ensayo con MTT con diferentes concentraciones (0,1-100 µg/ml) de Cetuximab glicosilado de acuerdo a la invención y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Erbix (Merck)). El ensayo con MTT es un ensayo no radiactivo basado en la escisión de la sal de tetrazolio MTT amarilla soluble (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo) por deshidrogenasas mitocondriales de células viables. Esto da como resultado la formación de un formazán púrpura, que puede medirse en un lector de ELISA a 570 nm. La señal de absorción es una medida directa de células viables en el cultivo.

Como control positivo, se inhibió completamente la proliferación por adición de taxol, y hlgG o medio solo sirvieron como controles negativos. En resumen, se cultivaron células A431 durante 4 días en placas de 96 pozos de fondo plano. Se añadieron variantes de Cetuximab y sustancias de control y se incubaron las placas durante otros 3-5 días a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada. Se removió el sobrenadante completamente y se añadió MTT. Se incubaron las células durante 2 horas con MTT a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada. Se retiró el sobrenadante y se lisaron las células usando HCl y regulador de lisis que contiene 2-propanol durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se midió la absorción a 570 nm/630 nm en un lector de placas Infinite F200 (Tecan Austria GmbH).

La Figura 5B muestra los resultados de un experimento realizado con Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (Cetuximab SP2/0) en diferentes placas dentro del mismo experimento. Se añadieron los controles en cada placa y se muestran en color más oscuro para Cetuximab (invención) y en color más claro para el Cetuximab SP2/0. Después de la incubación con Cetuximab, se observaron las células menos viables en comparación con el medio (en color verde) y el control hlgG1 (en color gris). El medio y el control hlgG1 mostraron la misma proliferación. El taxol como control positivo dio como resultado la inhibición máxima de la proliferación. Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención y Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 indujeron una inhibición dependiente de la concentración de la proliferación en las células A431. La inhibición de la proliferación fue comparable entre las dos variantes de Cetuximab.

En conclusión, el patrón de glicosilación mejorado de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención no influye negativamente en la actividad de inhibición del receptor del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab.

Ejemplo 5: Inducción de la apoptosis y lisis de células objetivo con anticuerpos glicosilados en forma diferente

Inducción de la apoptosis

La inducción de la apoptosis es un mecanismo adicional mediante el cual los anticuerpos pueden mediar la actividad antitumoral. Mientras que la inducción directa de la apoptosis por anticuerpos monoméricos es a menudo ineficaz, el entrecruzamiento del anticuerpo mediante inmunoglobulina antihumana o proteína G evoca este mecanismo de acción. In vivo, el entrecruzamiento del anticuerpo puede ser inducido por células que portan el receptor de Fc.

Con el fin de estudiar este modo potencial de acción, se analizó la inducción de apoptosis por variantes de Cetuximab glicosilados en forma diferente después del entrecruzamiento con la proteína G en las líneas celulares tumorales LS174T y A431. Como marcador para la inducción de apoptosis, se analizó la activación de caspasa-3 usando el kit de apoptosis de caspasa-3 activa BD PE. La caspasa-3, una cisteína proteasa, es una proteasa clave que se activa durante las primeras etapas de la apoptosis. Se sintetiza como una pro-enzima inactiva de 32 kDa que se procesa en células que experimentan apoptosis. La forma procesada se compone de dos subunidades (17 kDa y 12 kDa) que se asocian para formar la caspasa activa. La caspasa-3 activa se escinde proteolíticamente y activa otras caspasas, así como las objetivo en el citoplasma y en el núcleo, promoviendo así la apoptosis. Usando el kit de apoptosis de caspasa-3 activa BD PE, las células apoptóticas se inñen utilizando un anticuerpo específico para la forma activa de la caspasa-3 que no reconoce la forma de la pro-enzima inactiva de la caspasa-3.

En resumen, las líneas de células tumorales se cultivaron en medio libre de suero (A431) o reducido en suero (1%, LS174T) durante 24 h antes del ensayo. Se sembraron las células en placas de 48 pozos incubadas a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 24 h. Se añadieron variantes de Cetuximab o hlgG1 como control negativo a diferentes

concentraciones y proteína G a una concentración final de 2 µg/ml. Se incubaron las placas durante 4 a 48 h a 37°C en una incubadora de CO₂. Se recogieron las células, se permeabilizaron, se fijaron y se tiñeron para la caspasa-3 activa de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células positivas para caspasa-3 activa (apoptóticas) se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Canto II utilizando el software BD FACSDiva^{MR}.

- 5 Después del entrecruzamiento por la proteína G, las variantes de Cetuximab indujeron fuerte apoptosis dependiente de la concentración en las células A431 y LS174T. Como ejemplo, la Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de apoptosis de la caspasa-3 activa utilizando células A431. La inducción de apoptosis fue comparable entre Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cetuximab SP2/0).
- 10 Ensayo de ADCC
- Para determinar la influencia de diferentes patrones de glicosilación de los anticuerpos en la ADCC, se realizaron ensayos de liberación de europio.
- 15 En un primer ensayo, se analizaron las diferente lisis de las células objetivo utilizando el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab expresado por diferentes líneas celulares. En particular, se analizaron la lisis de las células LS174T por las PBMC humanas usando Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (baja sialilación de Fab, alta fucosilación de Fc), células CHO de roedores (baja sialilación de Fab, alta fucosilación de Fc), GT-5s (alta sialilación de Fab, alta fucosilación de Fc) y células Fuc⁻ derivadas de GT-5s (alta sialilación de Fab, baja fucosilación de Fc). El efector para la proporción de células objetivo (relación E:T) fue de 50:1 y el tiempo de incubación fue de 4 h. Los resultados se muestran en la Figura 7.
- 20 Tal como se demuestra mediante este ensayo, la cantidad de ácido siálico en la parte Fab del anticuerpo no influye en su actividad de ADCC. Sin embargo, un menor grado de fucosilación en la parte Fc conduce a una alta actividad de ADCC.
- 25 En un segundo ensayo, se determinó la lisis de las células LS174T por PBMC humanas primarias obtenidas de diferentes donantes ya sea homocigotos para FcγRIIIa-158F (F/F) o FcγRIIIa-158V (V/V), o heterocigotos para FcγRIIIa (F/V) usando Cetuximab expresado en células de ratón SP2/0 (baja sialilación de Fab, alta fucosilación de Fc) o células Fuc⁻ derivadas de GT-5s (alta sialilación de Fab, baja fucosilación de Fc). El efector para la proporción de células objetivo (relación E:T) fue de 80:1 y el tiempo de incubación fue de 5 h. Los resultados se muestran en las Figuras 8 a 10.
- 30 En un experimento adicional realizado con las PBMC de donantes diferentes en el mismo día (Figura 11), se demuestra que Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) tiene una actividad similar de ADCC para todos los diferentes tipos de donantes. En contraste con esto, la lisis específica mediada por Cetuximab expresado en células SP2/0 de ratón (Cetuximab SP2/0) mostró un notable aumento en la citotoxicidad en el donante VV en comparación con el donante FF.
- 35 Como se puede observar, los anticuerpos que tienen un bajo grado de fucosilación en la parte Fc y un alto grado de sialilación en la parte Fab (Fuc⁻) tienen una actividad de ADCC mucho mayor para todos los donantes que los anticuerpos que tienen un alto grado de fucosilación en la parte Fc y un bajo grado de sialilación en la parte Fab (SP2/0). Además, la actividad de ADCC de los anticuerpos de baja fucosa/ácido siálico alto también es comparable para cada uno de los diferentes donantes mientras que los anticuerpos de alta fucosa/ácido siálico bajo muestran una mayor actividad de ADCC para los donantes V/V.
- 40 En un tercer ensayo, se analizó la influencia de un alto grado de sialilación en la actividad de ADCC del anticuerpo anti-MUC-1 Pankomab. En los ensayos comparativos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, se analizó el efecto de la glicosilación de Pankomab producido en una línea celular mielóide humana que carece esencialmente de sialilación y GT-5s (con alta sialilación) y Pankomab producido en CHO. Todos los materiales se purificaron por cromatografía en una columna de proteína A.
- 45 Pankomab expresado en células sin sialilación y células con alta sialilación muestran lisis específica comparable contra células tumorales ZR-75-1 mientras que Pankomab expresado en CHO muestran una lisis considerablemente menor. La actividad de ADCC de Pankomab moderadamente sialilado y altamente sialilado es comparable (véase la Figura 12).
- Por lo tanto, la glicosilación completamente humana de Pankomab expresado en GT-5s se traduce en la producción de un anticuerpo con una actividad de ADCC ~ 5 veces mayor que Pankomab expresado en células CHO.
- 50 Además, se determinó la lisis de las células ZR-75-1 por PBMC humanas primarias obtenidas de donantes son homocigotos para FcγRIIIa-158F (F/F) utilizando el anticuerpo anti-TA-MUC1 Pankomab expresado en células GT-5s (alta sialilación de Fab, alta fucosilación de Fc) o células Fuc⁻ derivadas de GT-5s (alta sialilación de Fab, baja

fucosilación de Fc). El efector para la proporción de células objetivo (relación E:T) fue de 100:1 y el tiempo de incubación fue de 6 h. Los resultados se muestran en la Figura 13.

5 Como se puede observar, los anticuerpos que tienen un alto grado de fucosilación en la parte Fc y un alto grado de sialilación en la parte Fab (GT-5s) tienen una actividad de ADCC razonable alta. Sin embargo, la actividad de ADCC incluso aumentó para los anticuerpos con un bajo contenido de fucosa en la parte Fc (Fuc).

Esta mayor actividad de ADCC combinada con la vida media mejorada debido a las enseñanzas de la presente invención proporciona anticuerpos con mejor perfil clínico.

Ejemplo 6: Lisis de células objetivo que tienen una mutación K-Ras constitutivamente activa con anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención

10 Para demostrar la capacidad de los anticuerpos anti-EGFR que tienen un patrón de glicosilación optimizado de acuerdo con la presente invención para inducir la lisis de las células objetivo que tienen una mutación K-Ras constitutivamente activa a través de ADCC, se realizaron ensayos de liberación de europio.

15 En el ensayo, se utilizaron células de la línea celular epitelial de adenocarcinoma de pulmón humano A549 como células objetivo. El gen K-Ras en estas células comprende una mutación en el codón 12 que conduce a una proteína de K-Ras constitutivamente activa que tiene una mutación Gly-12-Ser. Como células efectoras, se utilizaron las PBMC humanas primarias obtenidas de diferentes donantes, ya sean homocigotas para FcγRIIIa-158F (F/F) o para FcγRIIIa-158V (V/V). Se indujo lisis de las células objetivo a través de ADCC por el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (alta sialilación de Fab, baja fucosilación de Fc). El efector para la proporción de células objetivo (relación E:T) fue de 80:1 y el tiempo de incubación fue de 5 h. Los resultados se muestran en la Figura 14.

20 Tal como se demuestra mediante este ensayo, los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la presente invención que tiene un patrón de glicosilación mejorado, en particular una alta sialilación de Fab y una baja fucosilación de Fc, son capaces de inducir lisis de células objetivo a través de ADCC, incluso para el células cancerosas objetivo que comprenden una ruta de transducción de la señal de EGFR constitutivamente activo, es decir que no pueden ser tratadas mediante el bloqueo de la unión del ligando a EGFR.

25 Ejemplo 7: Vida media en circulación de variantes de anticuerpos glicosilados de manera diferente

Para probar la dependencia de la vida media en la sialilación de un anticuerpo IgG, Cetuximab se expresó en células Fuc⁻ derivadas de GT-5s (Cetuximab (invención)) y se produjeron preparaciones de isotipos cargados en forma diferente. Se realizó un estudio farmacocinético en ratones.

30 El anticuerpo IgG purificado con proteína A fue sometido a cromatografía de intercambio iónico (CF) en un intercambiador aniónico y separado de acuerdo con las diferencias en su pI, fraccionado y combinado. La glicoperfilación de esos preparados que eluyen a diferentes valores de pH mostraron diferentes patrones de glicosilación. Además, se registró una glicoperfilación específica de Fab/Fc como se describe en el Ejemplo 1 e indica que principalmente sólo la glicosilación de Fab es relevante para el enriquecimiento de glicanos altamente sialilados ya que básicamente, no hay glicanos disialilados en la parte Fc del anticuerpo (véase la Figura 15A). Sin embargo, también se logró un aumento en S > 0 en glicanos de Fc de la combinación más negativamente cargada.

35 En el ensayo farmacocinético se compararon 2 muestras diferentes: (A) una mezcla de la combinación 1 y la combinación 2 (CF en intervalo de pH medio-alto), y (B) combinación 3 (CF en intervalo de pH bajo). Se inyectaron dosis de anticuerpo de 50 mg/kg en ratones y se recogieron muestras de suero en puntos específicos de tiempo. Se analizaron las muestras y se evaluaron con respecto a su contenido de anticuerpos mediante un ELISA del título de hIgG. En este estudio, se habían comparado preparaciones con un grado de sialilación total de 28% (A) y 49% (B) (véase la Figura 15B).

40 Como muestra la Figura 16, la preparación A tiene una vida media en circulación significativamente más corta ($T_{1/2} = 161,9$ h) que la preparación altamente sialilada B ($T_{1/2} = 199,5$ h). La preparación con sialilación inferior, especialmente con S2 inferior en la parte Fab, fue eliminada más rápidamente del suero.

45 Ejemplo 8: Actividad antitumoral de anticuerpos glicosilados de manera diferente

Anticuerpos anti-EGFR en xenoinjertos A431

Para la comparación de anticuerpos A431 glicosilados de forma diferente se utilizaron células de carcinoma de vulva epidérmica para preparar un modelo de xenoinjerto de ratón. Esta línea celular expresa en forma alta la proteína EGFR.

Se administraron Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) y Cetuximab expresado en células SP2/0 (Cetuximab SP2/0) por vía intravenosa dos veces por semana durante 3 semanas con niveles de dosis de 5 mg/kg y 50 mg/kg (N = 8f/grupo). El volumen de aplicación fue de 10 µl/g de peso corporal para ambas formulaciones de anticuerpos. El ajuste de la concentración en la solución de la inyección se realizó mediante dilución con PBS.

5 Los volúmenes tumorales medios relativos de los animales tratados se muestran en la Figura 17. Ambos anticuerpos inhiben el crecimiento tumoral dependiendo de la dosis en comparación con los animales tratados con PBS ($p < 0,001$). Los resultados de los grupos tratados con Cetuximab SP2/0 están de acuerdo con los datos publicados (Fichtner y colaboradores, 2008, Steiner y colaboradores, 2007, Goldstein y colaboradores, 1995). No se encontró diferencia significativa entre el volumen tumoral relativo en el grupo tratado con Cetuximab (invención) y el grupo tratado con Cetuximab SP2/0 en ninguno de los grupos de dosis. Se esperaban eficacias comparables de Cetuximab (invención) y Cetuximab SP2/0 ya que la ventaja del aumento de actividad de ADCC de Cetuximab (invención) no es relevante en ratones.

Todos los animales sobrevivieron hasta el final del estudio programado. No se observaron cambios significativos en el peso corporal de los animales lo que indica que no se presentó ninguna toxicidad importante en los animales tratados.

15 Anticuerpos anti-EGFR en xenoinjertos DU145

Además, se estudió la eficacia *in vivo* de Cetuximab (invención) en ratones desnudos atímicos que portan xenoinjertos de carcinoma prostático humano DU145. La línea celular DU145 es positiva para EGFR y se ha reportado que xenoinjertos de DU145 son sensibles al tratamiento con Erbitux®.

20 Un estudio preliminar ha demostrado que la administración de 50 mg/kg de Cetuximab (invención) dos veces por semana durante 3 semanas se tradujo en un fuerte efecto antitumoral en comparación con el grupo control. Posteriormente, se realizó un estudio de búsqueda del intervalo de dosis incluyendo cinco niveles de dosis diferentes que van desde 0,5 mg/kg hasta 50 mg/kg. Se administró Cetuximab (invención) (N = 7-8m/grupo) por vía intravenosa dos veces por semana durante 4 semanas. Se hizo un ajuste de la concentración en la solución de la inyección por dilución con regulador de la formulación. El volumen de aplicación se mantuvo constante en 10 µl/g de peso corporal. Ninguno de los animales tratados murió durante el transcurso del estudio. No se observaron cambios significativos en el peso corporal de los animales lo que indica que no se produjo ninguna toxicidad importante.

25 El volumen tumoral relativo medio de los animales se muestra en la Figura 18. Cetuximab (invención) inhibió fuertemente y en forma dependiente de la dosis el crecimiento del tumor DU145 comparado con los animales tratados con vehículo ($p < 0,001$). Los niveles de dosis de 0,5 a 50 mg/kg mostraron ser eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral. Las dosis más altas dieron como resultado un efecto más rápido y más pronunciado en comparación con dosis más bajas.

30 Anticuerpos anti-MUC1 en xenoinjertos de ZR-75-1

35 La eficacia antitumoral de Pankomab con diferentes grados de sialilación obtenida por expresión en diferentes líneas celulares fue investigada en un estudio adicional. El potencial terapéutico de ambos anticuerpos se investigó en ratones desnudos xenoinjertados con ZR-75-1. Se inyectaron células tumorales ZR-75-1 s.c. y se dejaron crecer hasta un tamaño medio de ~ 0,1 cm³. Pankomab sialilado expresado en células GT-5sS (Pankomab sial. +) o Pankomab no sialilado expresado en una línea celular tumoral mielóide humana deficiente en sialilación (Pankomab sial. -) fueron administrados en forma i.v. en grupos de 8 ratones dos veces por semana durante un período de 4 semanas. Se aplicaron cada vez dosis de 0,5 mg/kg y PBS sirvió como control. El peso corporal y el crecimiento del tumor fueron monitoreados. Como resultado la baja dosis de 0,5 mg/kg de Pankomab sialilado fue muy eficaz para inhibir el crecimiento del tumor mientras que Pankomab no sialilado fue menos eficaz. La Figura 19 muestra los resultados en función de los volúmenes tumorales relativos. Todos los resultados se expresaron como la media ± el error estándar de la media. Se realizó un ANOVA de dos vías de los volúmenes tumorales relativos para probar la influencia de la duración del tratamiento y la concentración del anticuerpo (software GraphPad Prism versión 5.02, GraphPad Software, EE.UU.). Se usaron pruebas posteriores de Bonferroni con un valor de p de 0,05 para evaluar la significación estadística de las diferencias entre pares de grupos.

40 En resumen, una dosis baja de la Pankomab sialilado expresado en células GT-5sS (0,5 mg/kg) provocó una inhibición efectiva del crecimiento tumoral en ratones desnudos xenoinjertados con ZR-75-1 ($p < 0,001$). Se considera que la mayor eficacia de Pankomab sialilado en comparación con Pankomab no sialilado es causada por una eliminación más lenta del anticuerpo sialilado de la circulación y, por tanto, una mayor biodisponibilidad.

45 Ejemplo 9: Actividad antitumoral contra diferentes tumores derivados del paciente

En este estudio, se evaluó la eficacia *in vivo* de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención) en ratones inmunodeficientes que portan xenoinjertos de carcinoma derivados de pacientes humanos de

5 NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) y el origen de CRC (cáncer colorrectal). Se supone que los xenoinjertos de células tumorales derivadas del paciente son incluso más similares al tejido original que las líneas celulares tumorales y por lo tanto se consideran de mayor relevancia clínica. Los modelos de tumores fueron seleccionados en función de su estado de expresión de EGFR positivo que ha sido evaluado por inmunohistoquímica, así como a su estado mutacional K-Ras. NSCLC # 7466 y CRC # 8397 muestran ambos una alta expresión de EGFR, mientras que NSCLC # 7466 comprende K-Ras de tipo silvestre, mientras que CRC # 8397 porta el mutante oncogénico, G12D constantemente activo de K-Ras.

10 Se administró Cetuximab (invención) (N = 8 m/grupo) en forma i.v. dos veces por semana durante 3 semanas con niveles de dosis de 5 mg/kg y 50 mg/kg. El ajuste de la concentración en la solución de la inyección se realizó por dilución con regulador de la formulación. El volumen de aplicación se mantuvo constante en 10 µl/g de peso corporal. El volumen tumoral relativo medio de los animales se muestra en la Figura 20. Como se ha demostrado, Cetuximab (invención) inhibe eficazmente el crecimiento de los tumores derivados de pacientes humanos, independientemente de su estado mutacional K-Ras.

15 Ninguno de los animales de los grupos tratados con Cetuximab (invención) murió prematuramente antes de la finalización del estudio. No se observaron cambios significativos en el peso corporal de los animales lo que indica que no se produjo ninguna toxicidad.

Ejemplo 10: Estudios toxicológicos

20 Se llevaron a cabo un estudio de toxicidad por administración repetida de dosis durante 4 semanas en monos cynomolgus y un estudio para hallar de intervalo de dosis durante 2 semanas en monos cynomolgus. Con base en estos estudios de toxicidad, el perfil de seguridad de Cetuximab glicosilado de acuerdo con la invención (Cetuximab (invención)) proporciona un peso suficiente de evidencia de que el fármaco candidato con anticuerpo monoclonal es bien tolerado y por lo tanto, el tratamiento de la población de seleccionada de pacientes será seguro. No se observaron índices inusuales o alarmantes de toxicidad que impidieran el uso del anticuerpo anti-EGFR en los seres humanos.

25 En contraste con los ratones, se demostró que los monos cynomolgus muestran *in vitro* e *in vivo* un aumento de la actividad de ADCC con IgG1 humano fucosilado desempleado, que es comparable con aquella del respectivo aumento de ADCC en sistemas de ensayo humanos. Por lo tanto se puede concluir que cualquier aumento teóricamente potencial en un toxicidad mediada por ADCC de Cetuximab optimizado con glicol en comparación con Cetuximab disponible comercialmente (Erbix) debe haber sido demostrado en el modelo de mono cynomolgus.

30 Se realizó un estudio adicional de toxicidad, con el anticuerpo anti-MUC1 Pankomab en ratas Wistar en Aurigon Life Science GmbH en condiciones de GLP de acuerdo con las directrices nacionales e internacionales (Ley alemana sobre productos químicos de 2002, OCDE de 1997, Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo 2004). Este estudio incluyó un estudio de determinación del intervalo de dosis para Pankomab expresado en células GT-5s administrado por vía intravenosa a ratas hembras, y un estudio de toxicidad por dosis repetidas intravenosas durante 4 semanas en ratas macho y hembra, seguido de un período de recuperación de 14 días. Los resultados del estudio para hallar el rango de las dosis y observaciones en vida del estudio de toxicidad de dosis que se repiten durante 28 días no indican ningún efecto relacionado con el compuesto.

40 Los resultados proporcionan evidencia suficiente de que los perfiles toxicológicos de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, es decir, que tienen el patrón de glicosilación mejorado descrito en este documento, no muestran mayor toxicología y son comparables con el estado de los anticuerpos del estado del arte que no tienen un patrón de glicosilación mejorado.

Listado de secuencias

<110> Glycotope GmbH

<120> Anticuerpos con el fragmento Fab glicosilado

<130> 52 947 K

45 <150> PCT/EP2010/004878

<151> 2010-08-10

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 605 304 T3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cetuximab CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Val His
1 5

<210> 2

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cetuximab CDRH2

15 <400> 2

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cetuximab CDRH3

<400> 3

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

25 <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 605 304 T3

<223> Cetuximab CDRL1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 5

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cetuximab CDRL2

10 <400> 5

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cetuximab CDRL3

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

20 <210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Pankomab CDRH1

<400> 7

Asn Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 8

<211> 19

ES 2 605 304 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pankomab CDRH2

5 <400> 8

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Thr Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pankomab CDRH3

<400> 9

His Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Pankomab CDRL1

<400> 10

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Phe Phe
1 5 10 15

<210> 11

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pankomab CDRL2

ES 2 605 304 T3

<400> 11

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pankomab CDRL3

<400> 12

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr
1 5

10

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> epitopo TA-MUC1

<400> 13

Pro Asp Thr Arg
1

<210> 14

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> epitopo TA-MUC1

25 <400> 14

Pro Asp Thr Arg Pro
1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

ES 2 605 304 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Alemtuzumab CDRH1

<400> 15

5 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Asn
 1 5 10

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Alemtuzumab CDRH2

<400> 16

 Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro Ser
 1 5 10 15

 Val Lys Gly

<210> 17

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Alemtuzumab CDRH3

20 <400> 17

 Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Alemtuzumab CDRL1

<400> 18

ES 2 605 304 T3

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Alemtuzumab CDRL2

<400> 19

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

10 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Alemtuzumab CDRL3

<400> 20

Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg Thr
1 5

<210> 21

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Solanezumab CDRH1

<400> 21

25 Arg Tyr Ser Met Ser
1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 605 304 T3

<220>

<223> Solanezumab CDRH2

<400> 22

Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Solanezumab CDRH3

<400> 23

Gly Asp Tyr
1

<210> 24

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Solanezumab CDRL1

<400> 24

20 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Solanezumab CDRL2

<400> 25

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

ES 2 605 304 T3

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Solanezumab CDRL3

<400> 26

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

Reivindicaciones

1. Un método para controlar la vida media en circulación de un anticuerpo o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende la etapa de
- (a) para aumentar la vida media en circulación
- 5 (a1) el aumento en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; y/o
- (a2) la disminución en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; o
- 10 (b) para la disminución de la vida media en circulación
- (b1) la disminución de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos; y/o
- 15 (b2) el aumento en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo de la cantidad de unidades de galactosa libres en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos;
- en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en
- 20 (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) los fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidas entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.
- 25
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos son hidratos de carbono de tipo complejo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa (a1) comprende una o más de las siguientes características:
- 35 (i) la cantidad de ácidos siálicos se aumenta de modo que en la composición al menos 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprende al menos un residuo de ácido siálico;
- (ii) se aumenta la cantidad de ácidos siálicos de modo que en la composición la cantidad promedio de residuos de ácido siálico por cadena de hidratos de carbono en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab es al menos 0,8;
- 40 (iii) la cantidad de ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en el parte Fab se incrementa mientras que en la composición menos de 20%, preferiblemente menos de 10% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fc de los anticuerpos o fragmentos o derivados los mismos comprenden al menos un ácido siálico; y
- 45 (iv) la etapa de aumentar la cantidad de ácidos siálicos incluye expresar el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en una célula o línea celular en condiciones donde la célula o línea celular tiene una elevada actividad sialilación; y/o
- en donde la etapa (a2) comprende una o más de las siguientes características:

- (i) la cantidad de unidades de galactosa libres disminuye, de manera que en la composición menos de 50% de los hidratos de carbono unidos a al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab comprende al menos dos unidades de galactosa libres; y
- 5 (ii) la etapa de disminuir la cantidad de unidades de galactosa libres incluye expresar el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en una célula o línea celular en condiciones donde la célula o línea celular tiene una alta actividad de sialilación.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo comprende al menos un sitio de glicosilación en la parte Fc, preferiblemente en la región CH2, más preferiblemente en el aminoácido Asn 297, y en donde el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tiene una o más de las siguientes características:
- 10 (i) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 50% de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos están glicosilados en la parte Fc;
- (ii) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de fucosa;
- 15 (iii) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 80%, preferiblemente al menos el 90% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de ácido siálico; y
- (iv) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 5% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tiene una o más de las siguientes características:
- 20 (i) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 70% de los hidratos de carbono unido a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos un residuo de galactosa;
- (ii) el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tiene un patrón de glicosilación humano;
- 25 (iii) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura $\text{Gal}\alpha(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$;
- (iv) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo o fragmento o derivado del mismo no comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc);
- 30 (v) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 40% de los ácidos siálicos en los hidratos de carbono unidos a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos están acoplados por un enlace 2,6;
- (vi) en una composición que comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, al menos 23% de los hidratos de carbono unidos a los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc);
- 35 (vii) el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgE, IgA, IgD o IgM, preferiblemente un anticuerpo IgG1 o IgG2, más preferiblemente un anticuerpo IgG1;
- (viii) el anticuerpo es un anticuerpo humano, de ratón, de rata, de cabra, de primate o de camello;
- (ix) el anticuerpo es un anticuerpo modificado genéticamente, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado; y
- 40 (x) en la composición al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo porta bisGlcNAc.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo se selecciona de
- (a) un anticuerpo anti-EGFR quimérico o humanizado que comprende

- (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- 5 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
- (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 85 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- 10 (iv) un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2; y
- (b) un anticuerpo anti-TA-MUC1 quimérico o humanizado que comprende
- (i) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;
- 15 (ii) opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;
- (iii) un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 54 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- 20 (iv) un sitio de glicosilación presente en la parte Fc en la posición del aminoácido 297 de la región constante de cadena pesada 2.
7. Una composición del anticuerpo que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados de los mismos, caracterizado porque los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos comprenden al menos un sitio de glicosilación presente en su parte Fab, y caracterizado porque en la composición al menos 65% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos un residuo terminal de ácido siálico y/o menos de 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho al menos un sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos portan al menos dos unidades de galactosa libres; en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier amino ácido excepto Pro; y en donde el fragmento funcional o derivado de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en
- 25 (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) los fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidas entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.
- 35
- 40 8. Una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-EGFR quimérico o humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, caracterizada porque el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 85 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat, en donde en la composición al menos 65% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos un residuo de ácido siálico terminal y/o menos del 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos dos unidades de galactosa libre,
- 45
- 50 en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro.

9. La composición del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el anticuerpo tiene todas las siguientes características
- (i) el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fc;
 - (ii) en la composición al menos 80% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de fucosa;
 - 5 (iii) en la composición al menos 70%, preferiblemente al menos 80% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de ácido siálico;
 - (iv) en la composición al menos 10% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante;
 - 10 (v) en la composición al menos 70% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo portan al menos un residuo de galactosa;
 - (vi) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura $\text{Gala}(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$; y
 - (vii) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc);
 - 15 (viii) opcionalmente, en la composición preferiblemente al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fab del anticuerpo o fragmento o derivado del mismo portan bisGlcNAc.
10. Una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-MUC1 quimérico o humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, una CDRH2 que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 8 y una CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDRL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, caracterizada porque el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fab en la posición del aminoácido 54 de la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat, en donde en la composición al menos 65% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos un residuo de ácido siálico terminal y/o menos del 35% de los hidratos de carbono unidos a dicho sitio de glicosilación presente en la parte Fab portan al menos dos unidades de galactosa libres; en donde el sitio de glicosilación consiste en la secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido excepto Pro.
- 20
- 25
11. La composición del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, donde el anticuerpo tiene todas las siguientes características
- 30 (i) el anticuerpo comprende un sitio de glicosilación presente en la parte Fc;
 - (ii) opcionalmente en la composición al menos 80% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de fucosa;
 - 35 (iii) en la composición al menos 80% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc no portan un residuo de ácido siálico;
 - (iv) en la composición al menos 5% de los hidratos de carbono unidos a la parte Fc portan un residuo de N-acetilglucosamina bisectante;
 - (v) en la composición al menos 70% de los hidratos de carbono unidos al anticuerpo portan al menos un residuo de galactosa;
 - 40 (vi) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden un epítipo Galili que tiene la estructura $\text{Gala}(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$; y
 - (vii) los hidratos de carbono unidos al anticuerpo no comprenden residuos de ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc).
12. La composición del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11; en donde los hidratos de carbono unidos al sitio de glicosilación presente en la parte Fab de los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos son hidratos de carbono de tipo complejo.
- 45

13. La composición del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 para uso en medicina, preferiblemente en el tratamiento de cáncer.

14. La composición del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para su uso en el tratamiento del cáncer

(a) después del fracaso del tratamiento con Erbitux; y/o

5 (b) en donde las células tumorales comprenden al menos una mutación activadora en una ruta de transducción de señales de EGFR, en donde mutación activadora se traduce preferiblemente en un mutante K-Ras constitutivamente activo, un mutante PI 3 quinasa constitutivamente activo, o una sobreexpresión de Raf quinasa.

10 15. Un método para producir una composición del anticuerpo que comprende un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo que tiene una vida media deseada en circulación, que comprende la etapa de expresar dicho anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo en una célula huésped, en donde el método para controlar la vida media del anticuerpo o fragmento o derivado mismo de acuerdo con la reivindicación 1 se realiza mediante la etapa (a1), la etapa (a2), la etapa (b1) o la etapa (b2) de dicho método; en donde el fragmento funcional o derivado del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en

15 20 (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que constan de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) los fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidas entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera sólo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular.

25

30

Figura 1

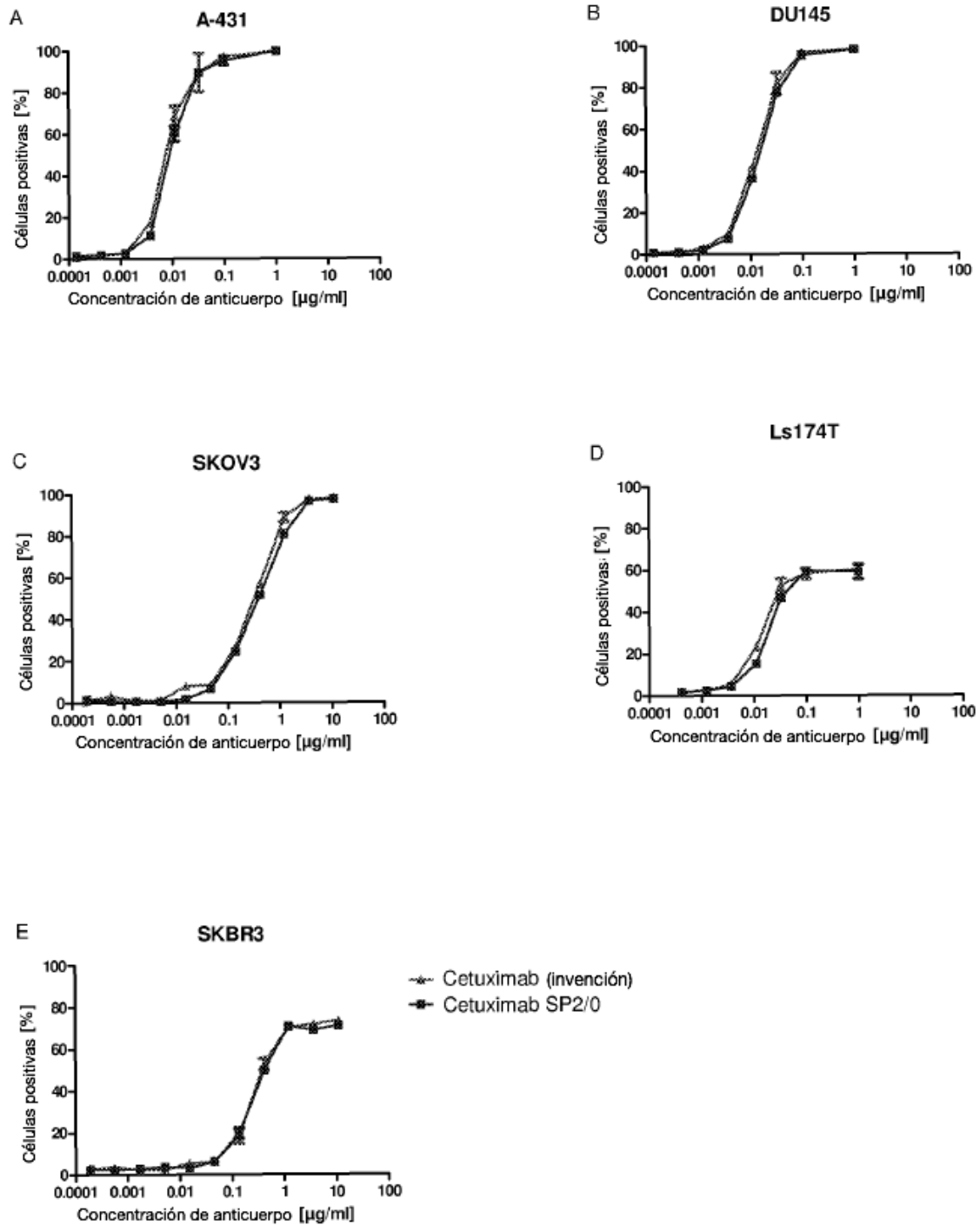


Figura 2

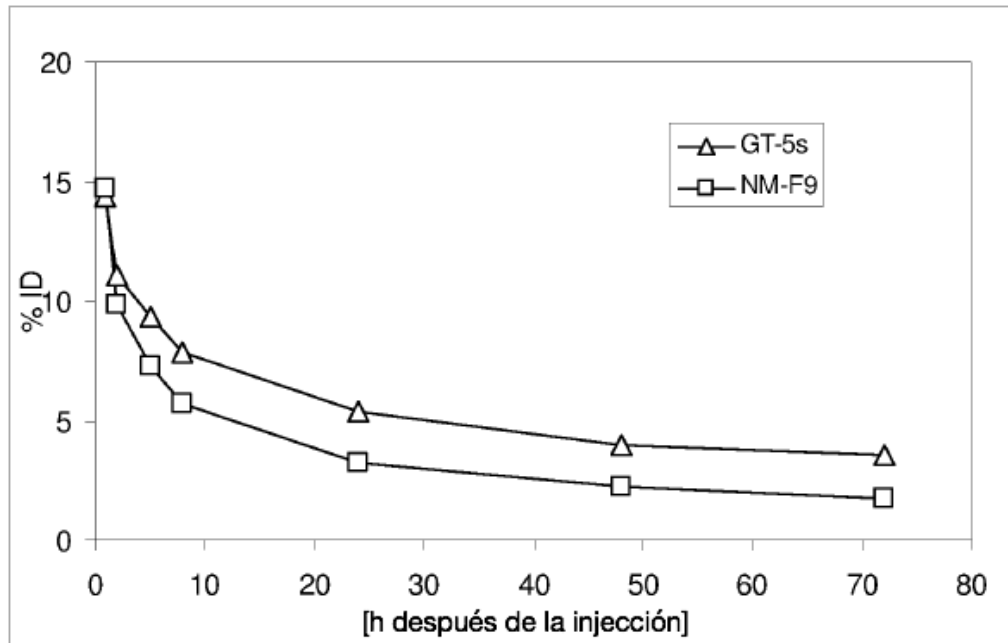


Figura 3

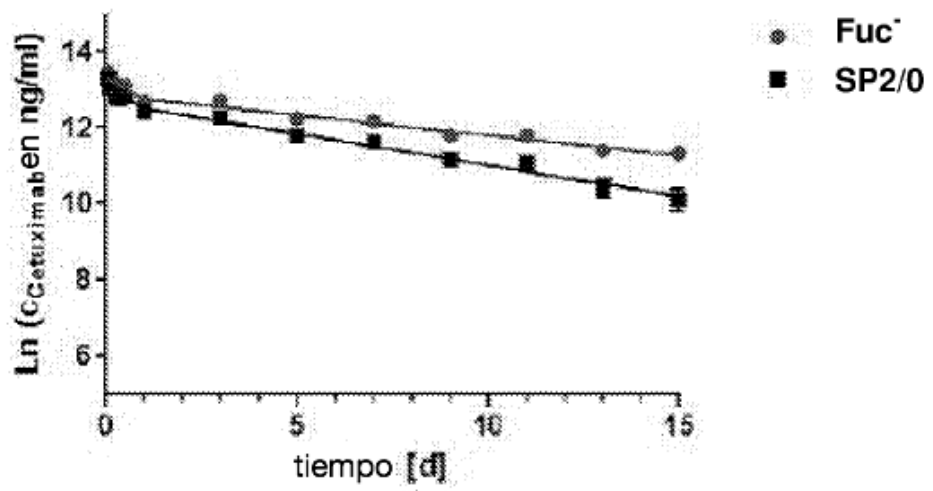


Figura 4

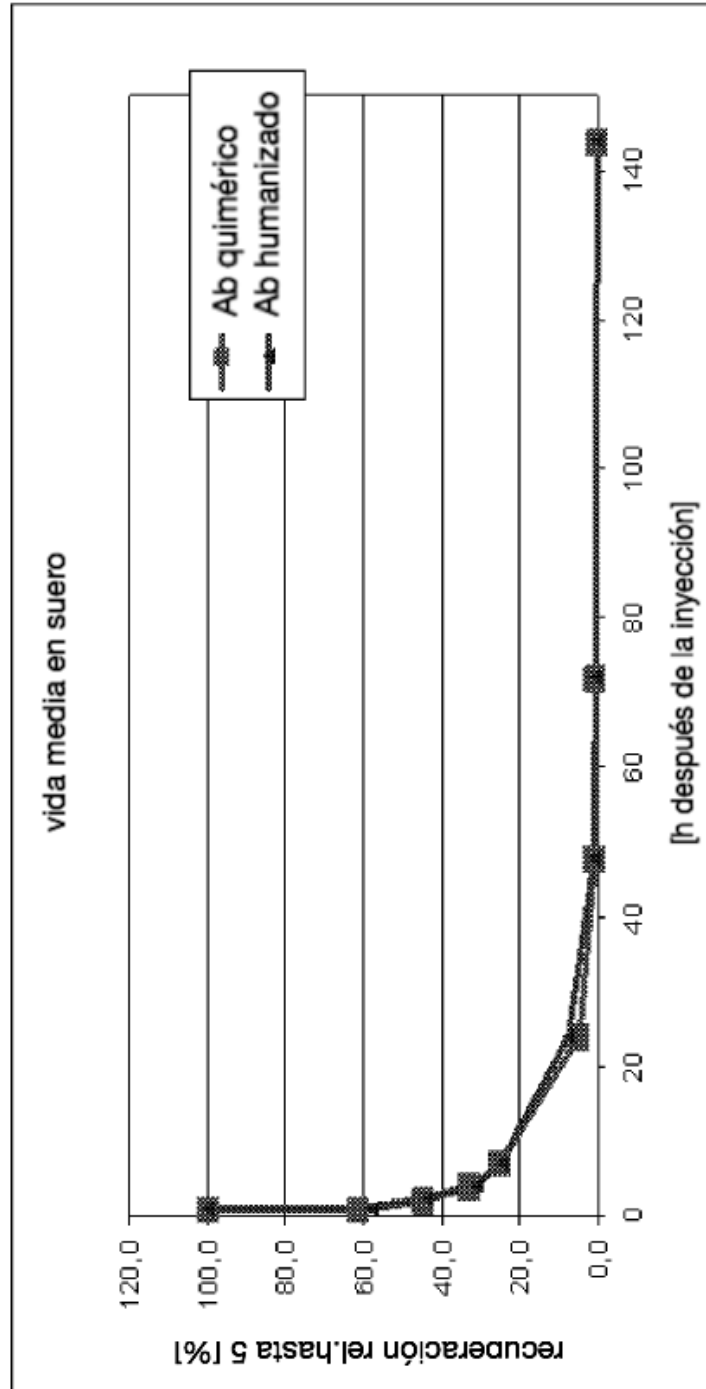
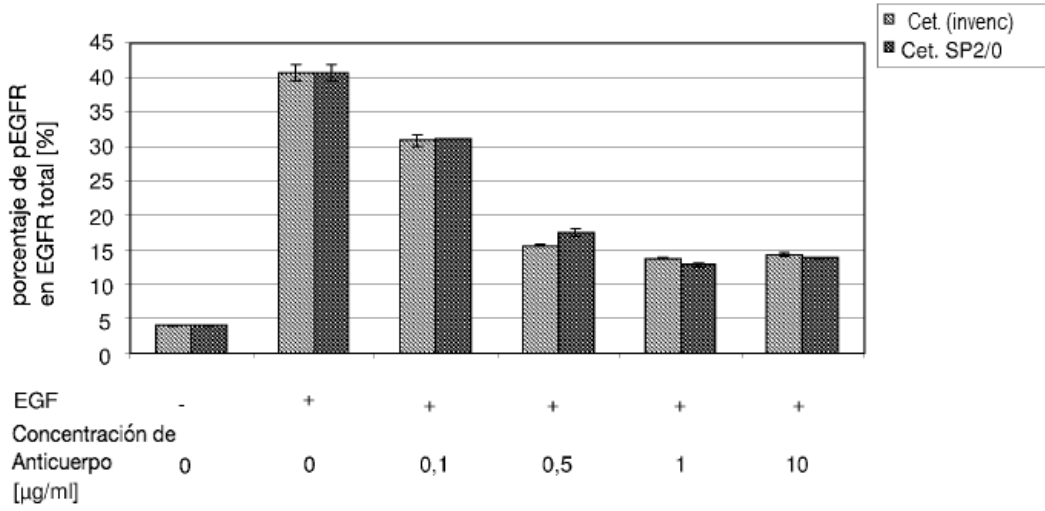


Figura 5

A



B

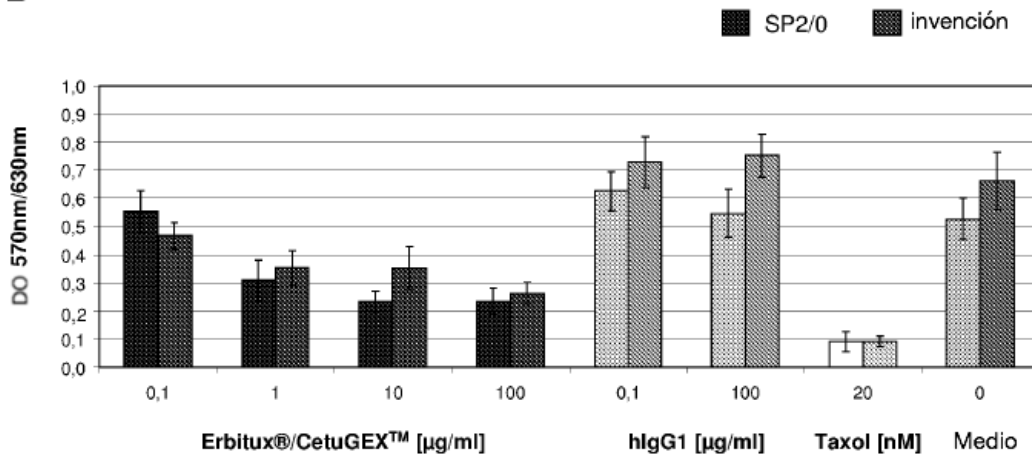


Figura 6

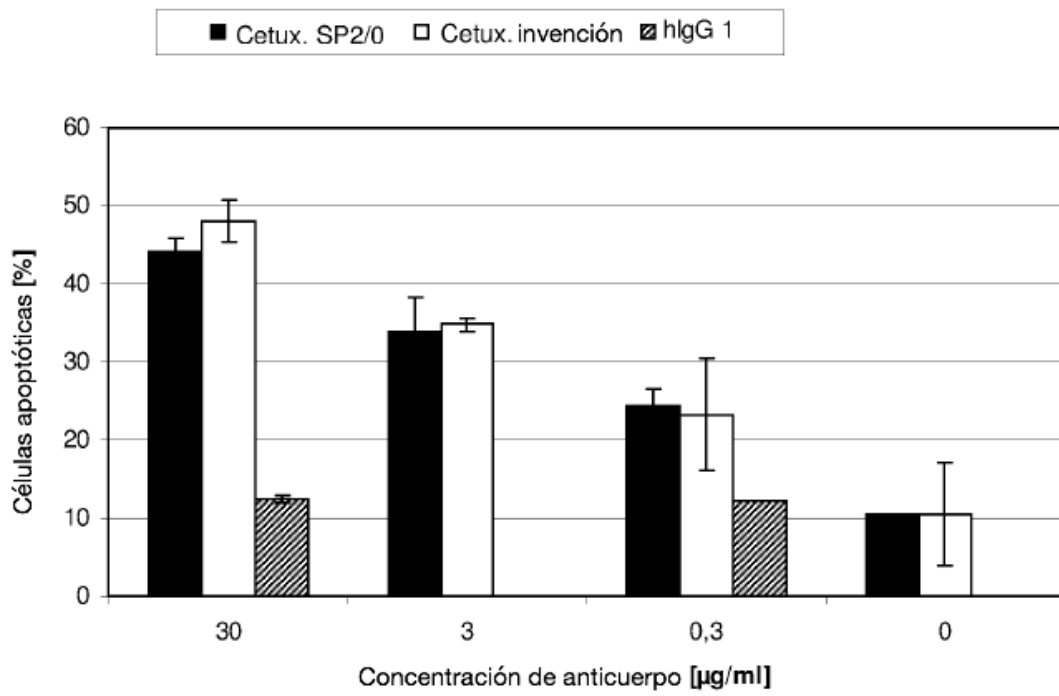


Figura 7

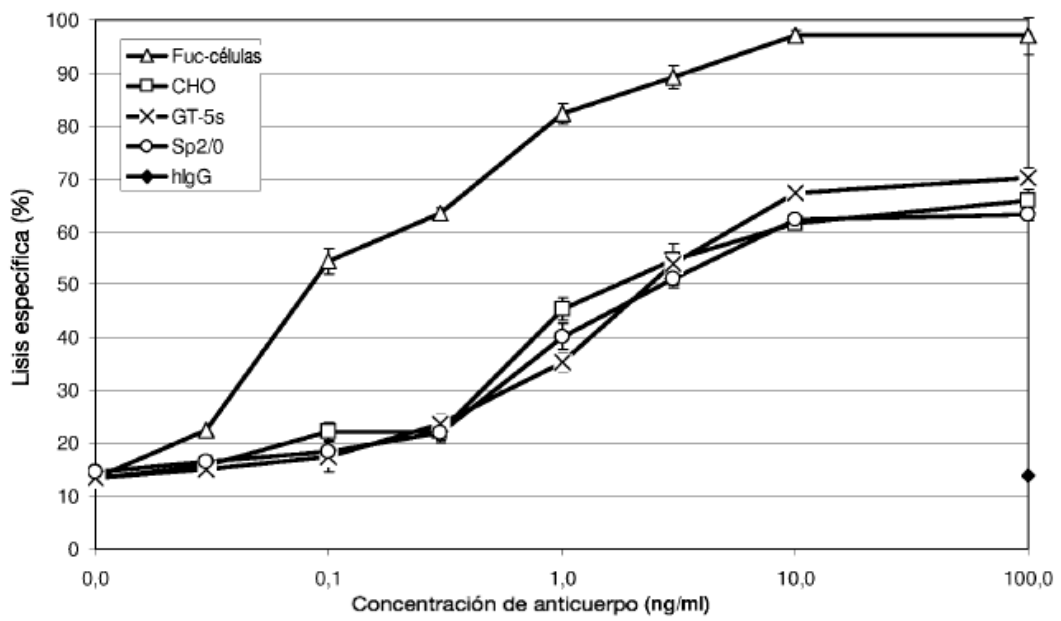


Figura 8

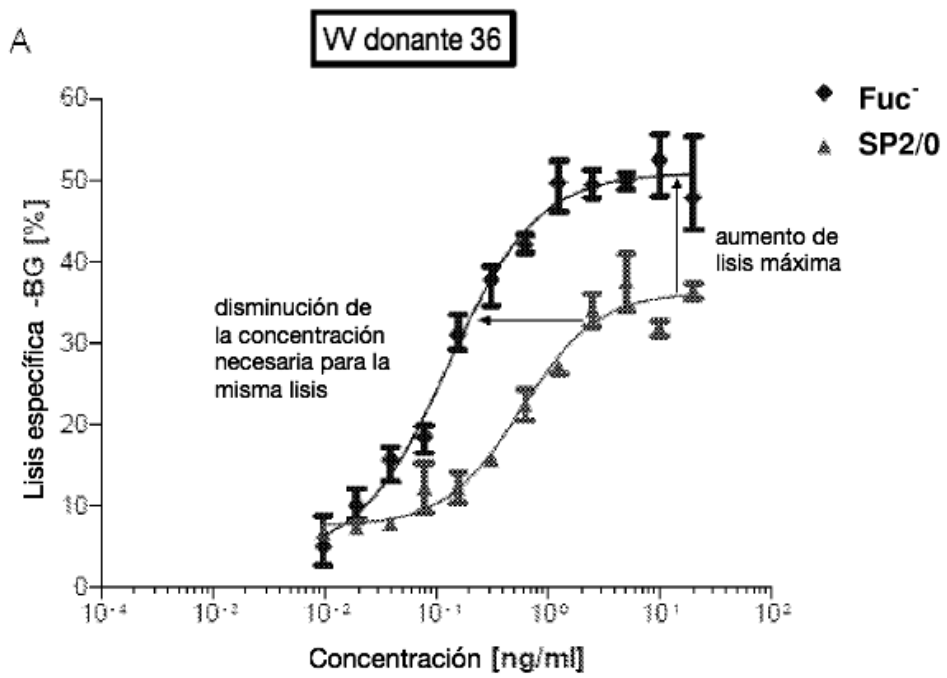


Figura 9

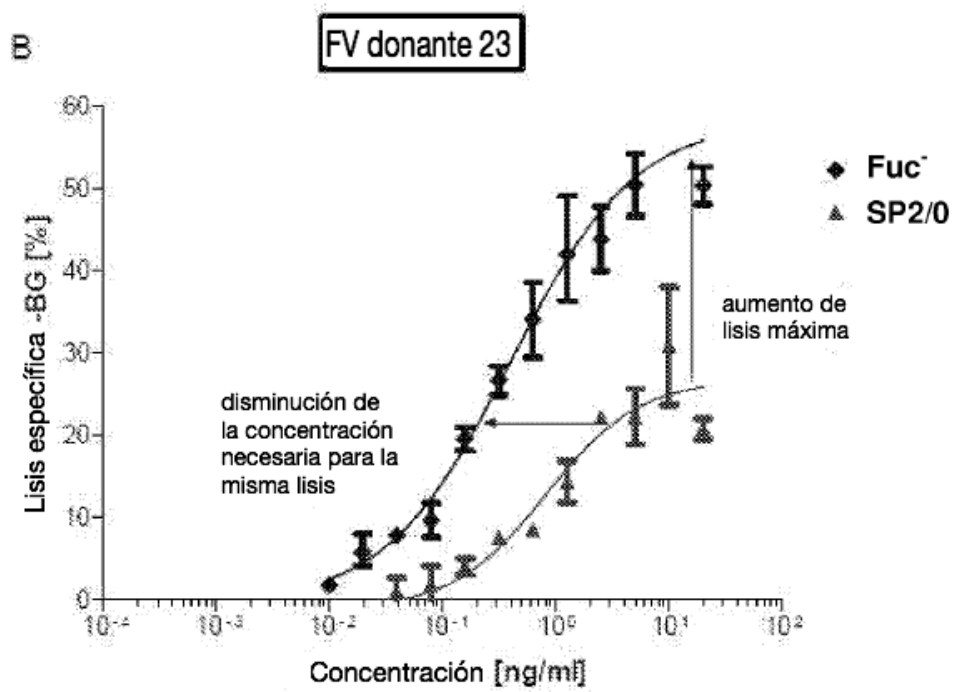


Figura 10

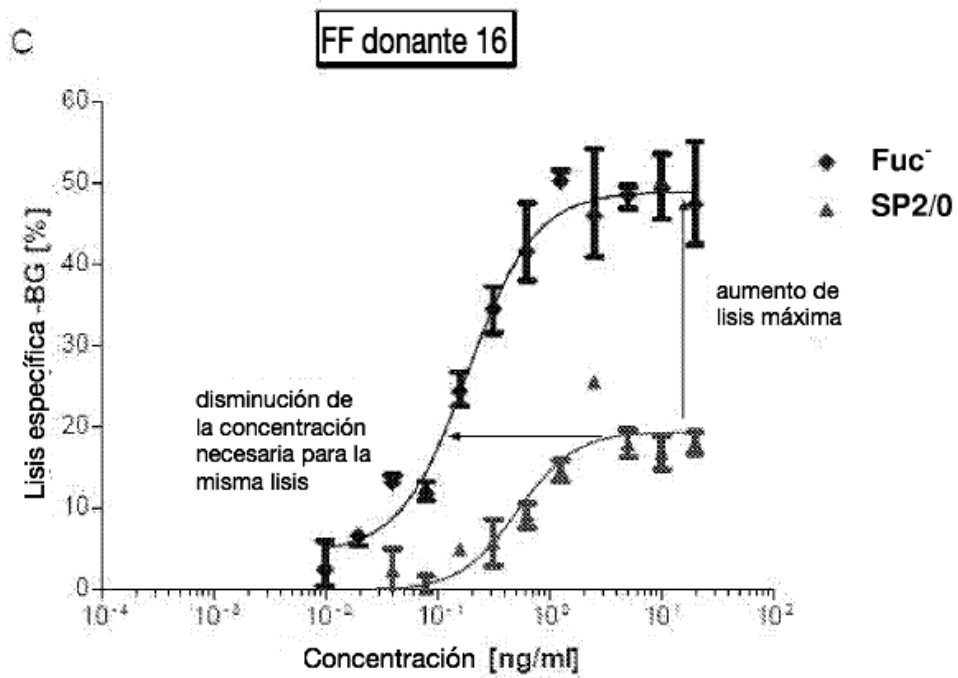


Figura 11

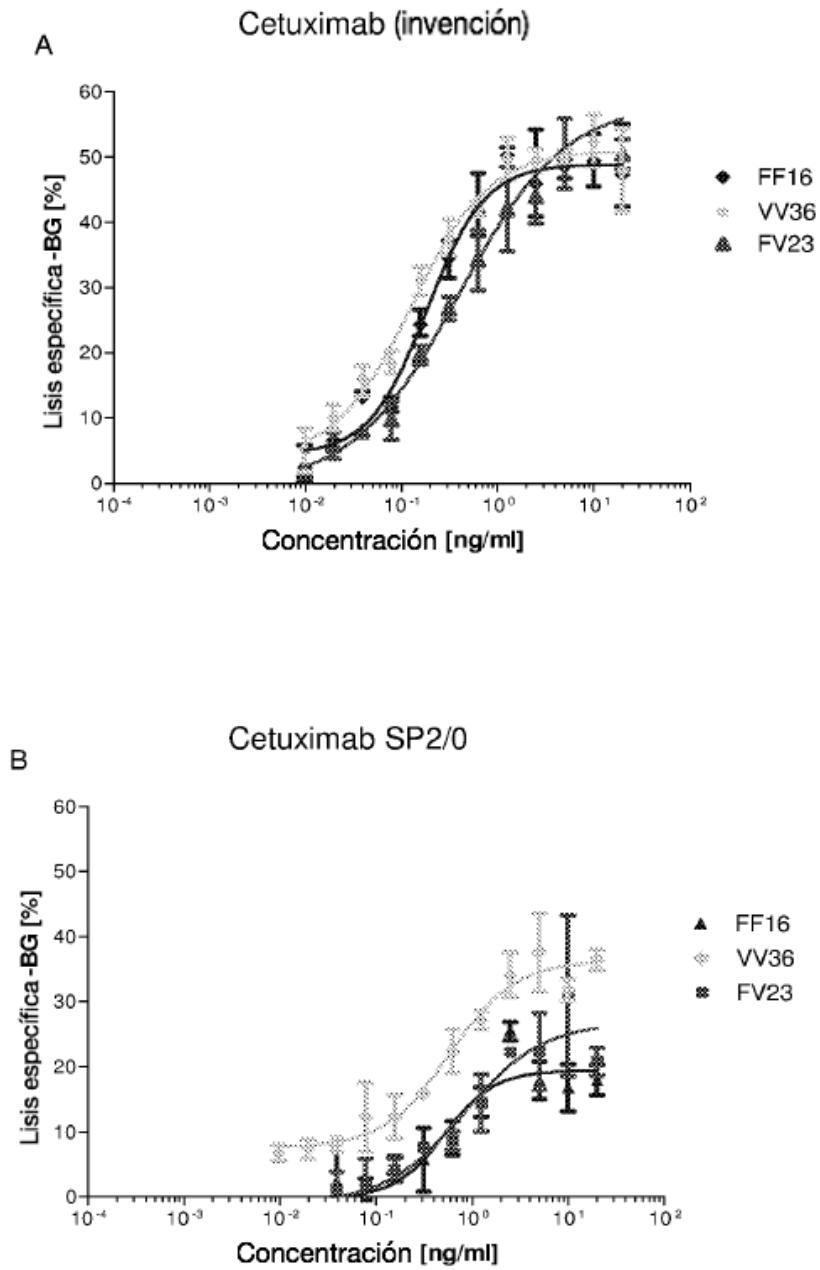


Figura 12

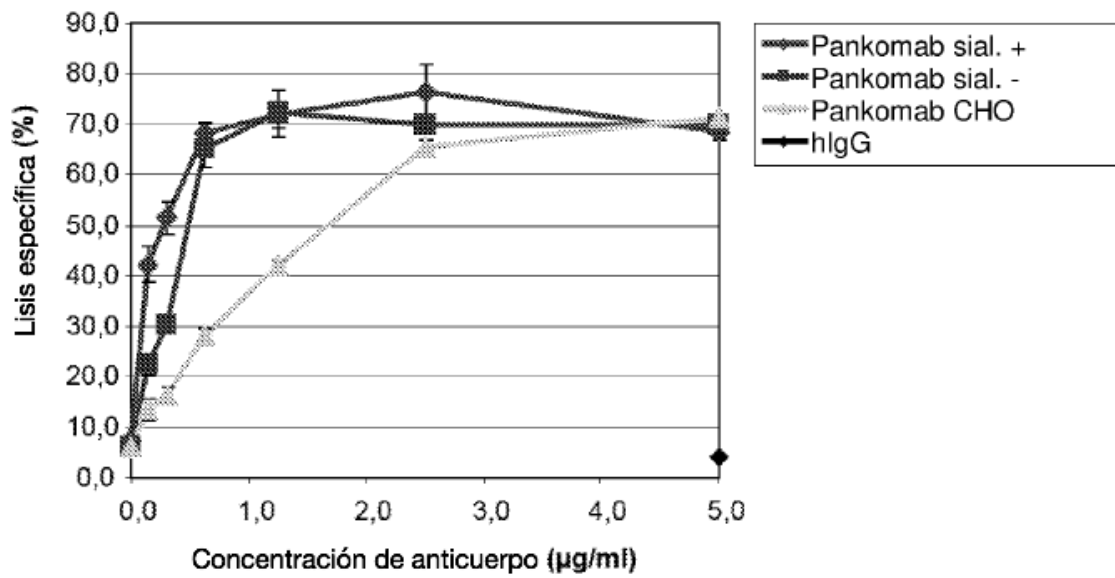


Figura 13

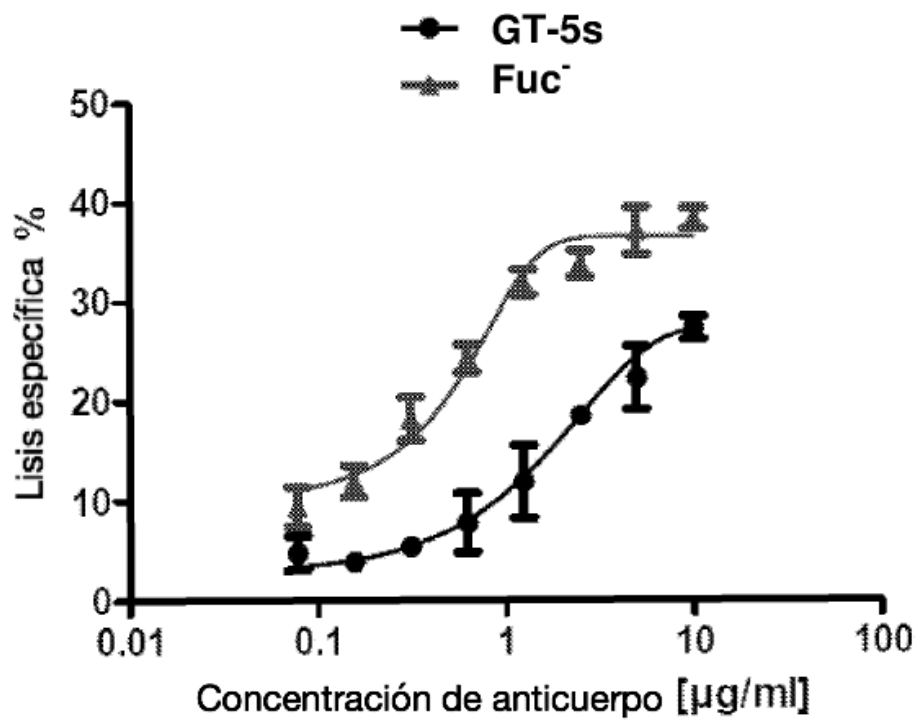


Figura 14

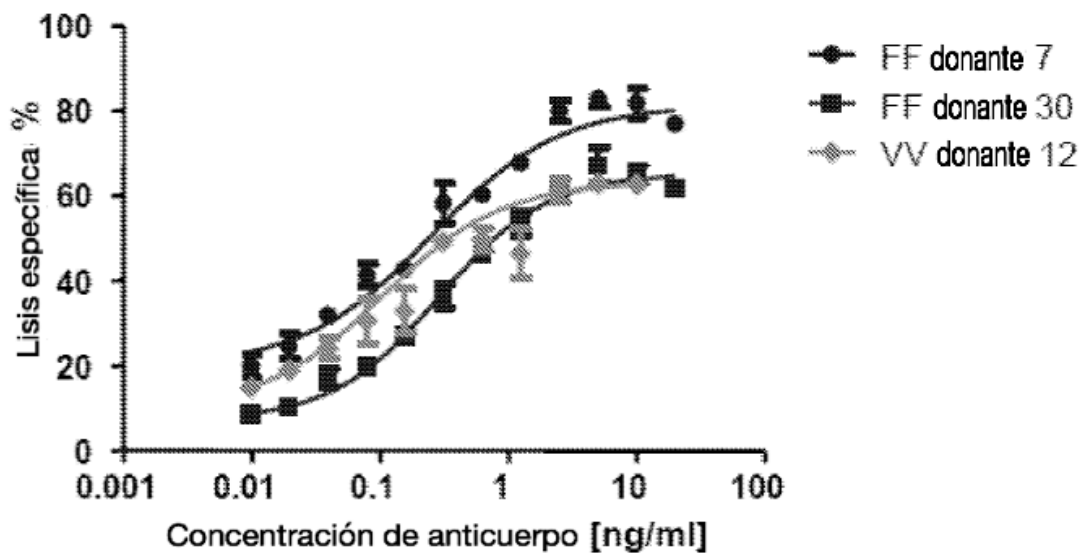
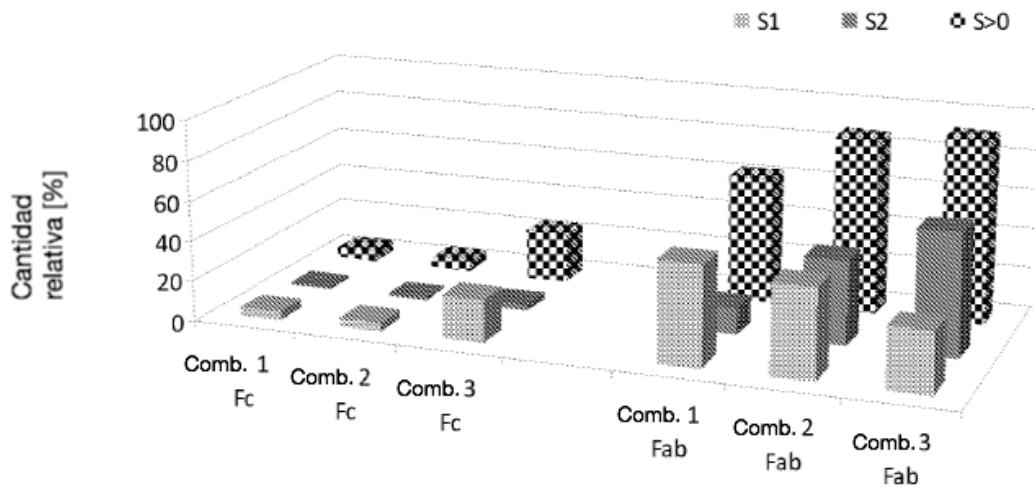


Figura 15

A



B

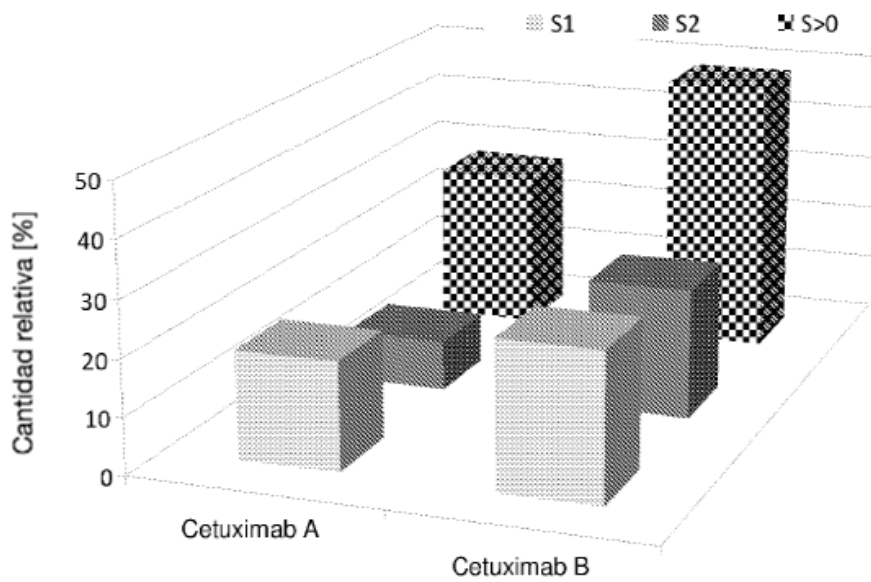


Figura 16

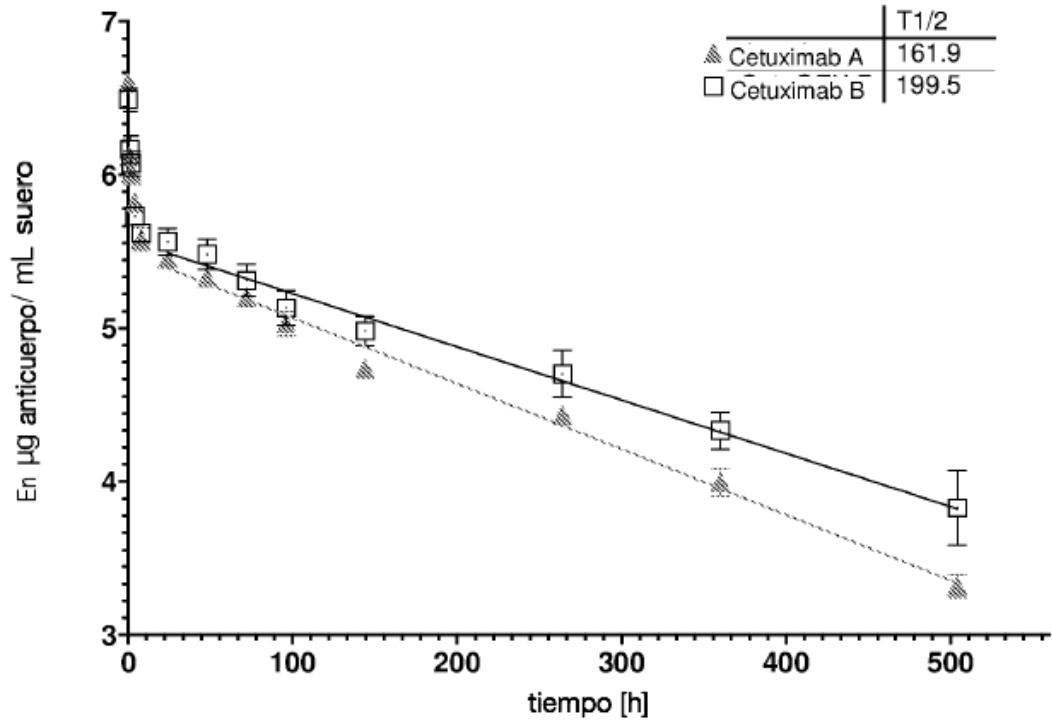


Figura 17

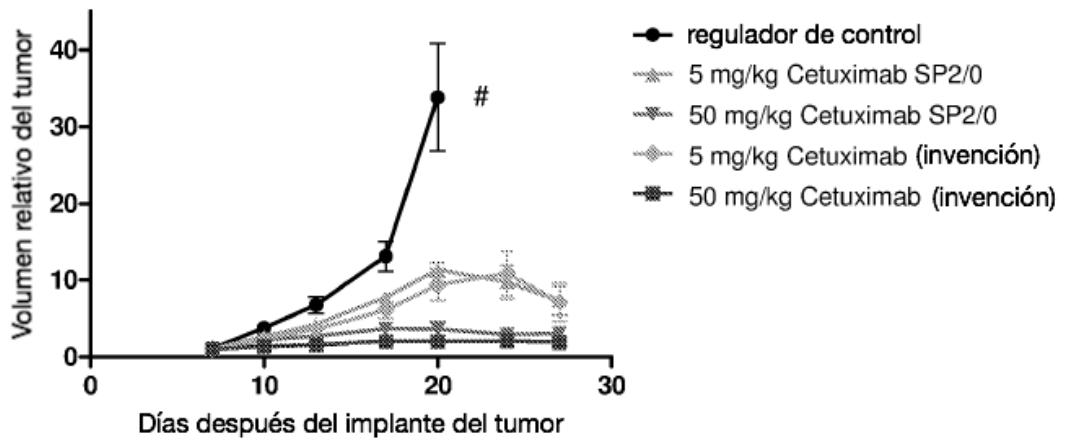


Figura 18

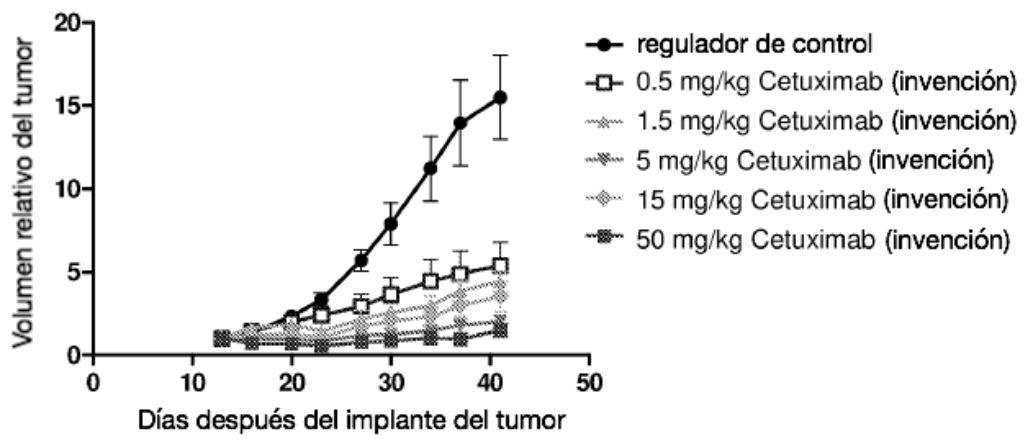


Figura 19

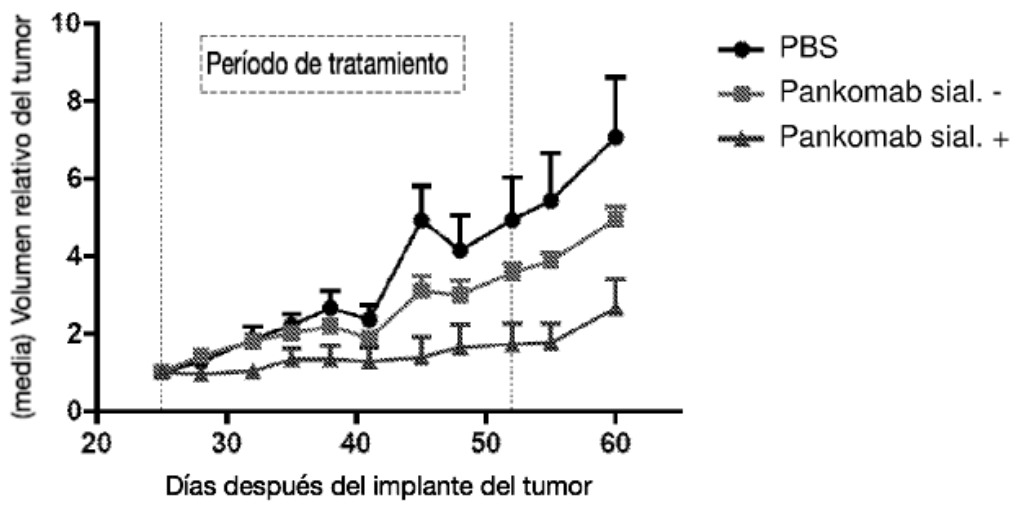


Figura 20

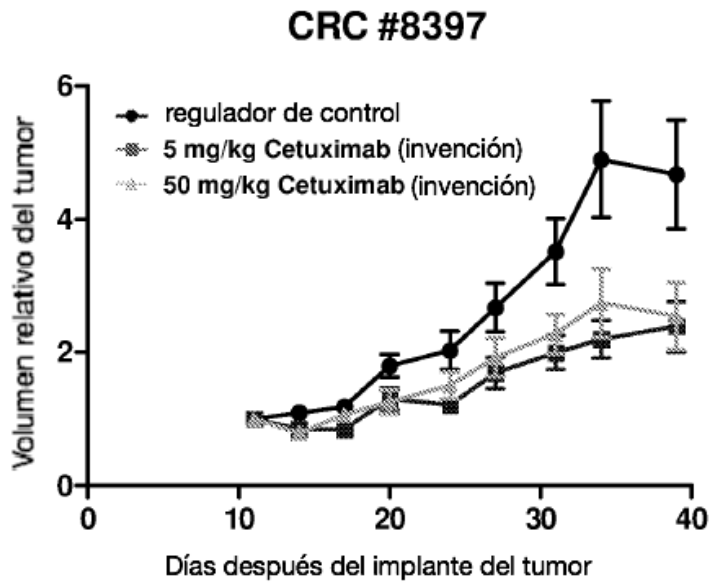
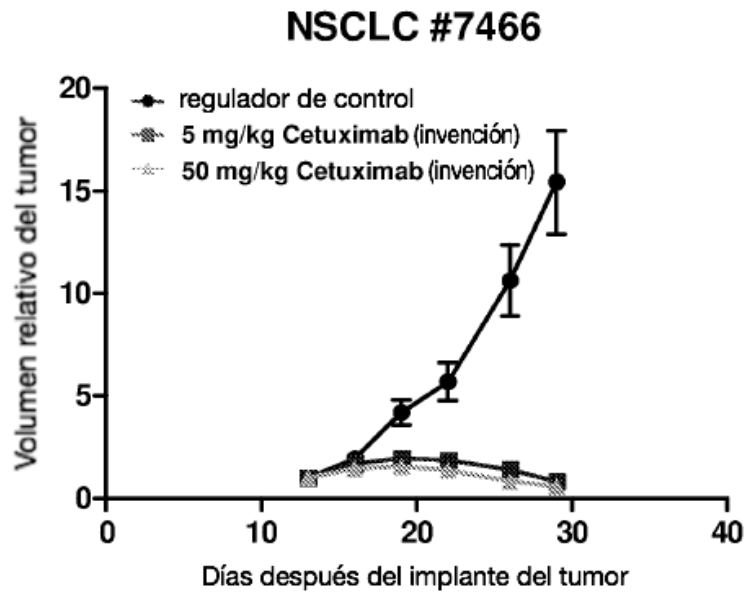
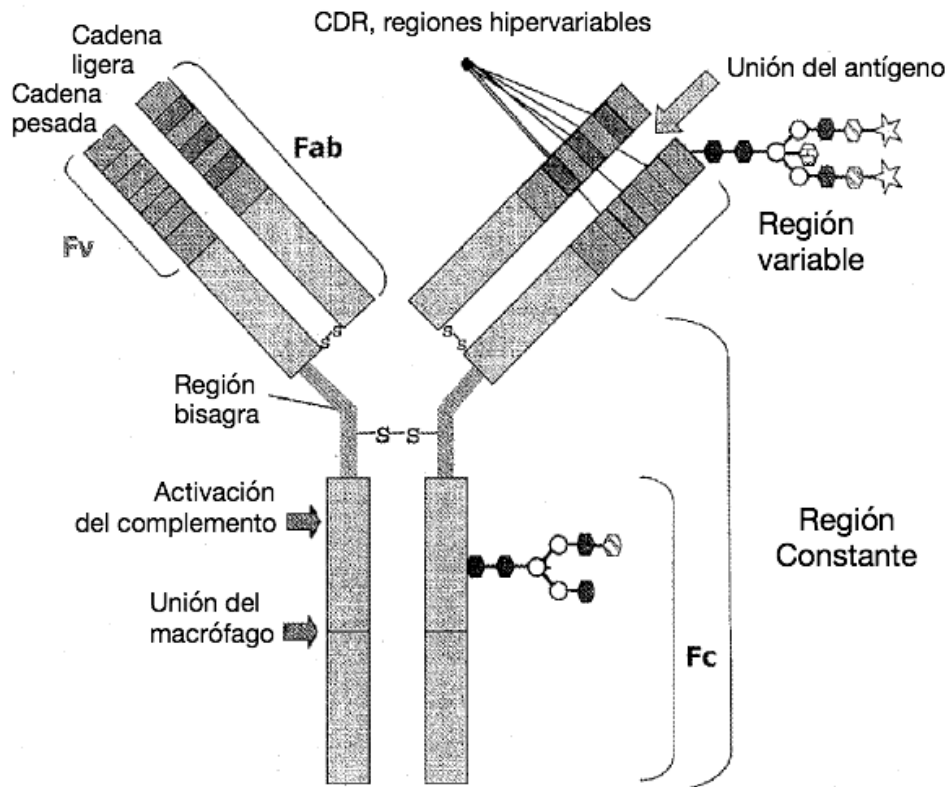


Figura 21

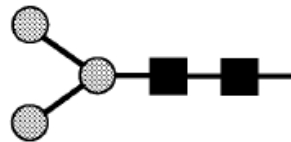
A



☆	= ácido siálico
⬡	= Galactosa
⬢	= GlcNAc
○	= Manosa
▼	= Fucosa
⬢	= GlcNAc bisectante

Figura 21 (continuación)

B



C

