

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 102**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2010 PCT/US2010/053948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11059684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10830418 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2494061**

54 Título: **Variantes de anticuerpo de glicosilación**

30 Prioridad:

**29.10.2009 US 255986 P**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LUO, JINQUAN;  
MCCARTHY, STEPHEN;  
RAJU, T., SHANTHA;  
SCALLON, BERNARD y  
SPINKA-DOMS, TRACY**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 622 102 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).

**Variantes de anticuerpo de glicosilación****Descripción**5 **ANTECEDENTES****Campo de la invención**

10 **[0001]** La invención se refiere a la evaluación de la secuencia de Fc de anticuerpos y otras moléculas que contienen Fc y, más particularmente, a métodos de preparación, alterando y usando preparaciones de anticuerpos y otras moléculas que contienen Fc para alterar la susceptibilidad a proteasas.

**Discusión del campo**

15 **[0002]** Modificaciones de aminoácidos dentro del dominio Fc puede tener lo que se puede considerar efectos alostéricos, es decir, que afecta a la conformación de Fc de una distancia. En particular, se ha demostrado que las sustituciones de aminoácidos en el dominio de CH3 afectan la unión a los receptores de Fc-gamma, los cuales se unen al anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro intercadena entre cadenas pesadas (la región de bisagra inferior) que es también el dominio de CH2 (Shields et al. (2001) J Biol Chem 276: 6591, Stavenhagen et al. (2007) Cancer Res 67: 8882).

20 **[0003]** En el anticuerpo maduro, los dos oligosacáridos bi-antenarios complejos unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto del polipéptido. Se ha encontrado que su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en las funciones efectoras, tales como ADCC (Lifely, MR, et al., Glycobiology 5: 813-822 (1995), Jefferis, R. y col., Immunol Rev 163: 59 - 76 (1998), Wright, A. y Morrison, SL, supra). Los estudios realizados por otros y por los presentes solicitantes (WO2007005786) han demostrado además que la composición de oligosacáridos de estos glicanos naturalmente añadidos en la región Fc también altera las afinidades de unión al receptor Fc y la sensibilidad a la proteasa en diversos sitios no adyacentes de la cadena polipeptídica (Raju, S.T. 2008 Curr Op Immunol 20: 471 - 478; WO2007024743). El documento WO2009045894 describe métodos y conformaciones estructurales de preparaciones de anticuerpos con mayor resistencia a proteasas. El documento US5041376 describe un método para identificar o proteger sitios funcionales o epítopos de proteínas que entran en la vía exocitótica de células eucariotas.

25 **[0004]** Por lo tanto, a medida que la comprensión de los diversos aspectos conformacionales de moléculas de anticuerpo evoluciona y técnicas de modelización y de ingeniería de proteínas se vuelven más sofisticados, ahora se hace posible orientar regiones dentro de candidatos de anticuerpos terapéuticos para la modificación para que coincida con el espectro deseado interacciones *in vivo* para un uso o indicación particular. Dicha modificación puede proporcionar anticuerpos terapéuticos mejorados con seguridad retenida.

40 **RESUMEN DE LA INVENCION**

45 **[0005]** La invención proporciona una molécula que contiene Fc, que comprende una secuencia de aminoácido de dominio Fc de anticuerpo modificado con sitios de glicosilación N en los extremos de las estructuras de bucle en el dominio CH3, en el que el Fc que contiene la molécula ha aumentado la resistencia a la proteasa, en comparación con Fc que contiene moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos del dominio Fc del anticuerpo no modificado análogo.

50 **[0006]** La invención proporciona además un método para aumentar la resistencia de una proteína que contiene Fc a la escisión por una proteasa, que comprende la adición de sitios de N-glicosilación de la proteína que contiene Fc correlativa a la numeración de UE en al menos una de las posiciones 359, 382, y 419.

55 **[0007]** La presente invención proporciona las composiciones de modificado, inmunoglobulina glicosilada dominios constantes útiles en la ingeniería de anticuerpos o similares a anticuerpos terapéuticos, tales como los que comprenden una región Fc, que tiene uno o más sitios de glicosilación diseñados unidos a Asn ("N-glicosilación").

60 **[0008]** En una realización de la invención, no es un sitio de N-glicosilación en la posición 359 a partir de una mutación en la posición 361 y/o un sitio de N-glicosilación en la posición 419 a partir de una mutación en la posición 421. Adicionalmente, la glicosilación Fc nativa en Asn297 está presente y en otra realización la glicosilación Fc nativa puede estar ausente. Las construcciones derivadas de anticuerpos son estructuras de proteínas dimericas derivadas o que comprenden secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. En un aspecto, las construcciones contienen sustituciones de aminoácidos en las posiciones 228, 234 o 235 (numeración Kabat EU) en la región bisagra.

65 **[0009]** Otro objeto de la invención comprende compuestos basados en los dominios constantes de inmunoglobulina glicosilados modificados con propiedades mejoradas en comparación con compuestos que tienen dominio constante de inmunoglobulina no modificada análoga; las propiedades que incluyen, pero no se limitan a, la sensibilidad a la

proteasa, la semivida del suero y la unión al receptor Fc.

**[0010]** Es un objeto adicional de la invención proporcionar composiciones y métodos para mejorar la capacidad de las preparaciones de anticuerpos glicosilados para resistir la escisión por proteasas y por lo tanto proporcionar preparaciones de anticuerpos para el tratamiento de condiciones patológicas asociadas con la presencia de niveles elevados de proteasas, tales como cáncer. En aún otra realización del método, la proteína que contiene Fc glicosilada es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico. La proteasa, cuya actividad de escisión debe resistirse, se selecciona del grupo que consiste en pepsina, plasmina, tripsina, quimotripsina, una metaloproteinasa de matriz, una endopeptidasa de serina, y una cisteína proteasa, procedente del huésped o un patógeno que puede ser un parásito, una bacteria o un virus. En una realización específica, la proteasa es una metaloproteinasa de matriz seleccionada del grupo que consiste en gelatinasa A (MMP2), gelatinasa B (MMP - 9), metaloproteinasa de matriz 7 (MMP - 7), estromelina (MMP - 3), y elastasa de macrófagos (MMP - 12). Las modificaciones se pueden introducir en secuencias de anticuerpos. Las construcciones modificadas descritas muestran una mayor resistencia a proteasas fisiológicamente relevantes.

### Breve descripción de los dibujos

#### [0011]

**La Figura 1** muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de bisagra y los dominios Fc de variantes basadas en IgG4 y donde el número se basa en el número de anticuerpos UE de Kabat. La secuencia mostrada comienza con la bisagra de núcleo (residuo 227) y termina con el extremo C del dominio Fc (residuo 447) indicando que CNTO 5303 y CNTO 7363 difieren de CNTO 530 y CNTO 736, respectivamente, por tener un Asn (N) en la posición 359 en lugar de un Thr, y un Thr (T) en la posición 361 en lugar de un Asn, dando como resultado la creación de un motivo de glicosilación y haciendo que la proteína sea glicosilada en Asn359. Las variantes CNTO 5304 y CNTO 7364 difieren de la CNTO 5303 y la CNTO 7363 al tener Thr en la posición 299 reemplazado con Asn, eliminando así el motivo y la glicosilación en Asn297. La secuencia NEM 3052, al cambiar los aminoácidos en las posiciones 419 y 421, da como resultado motivo de glicosilación y glicosilación en la posición 419. Otro sitio mostrado para una creación de posición de motivo de glicosilación está entre 382 y 384 mostrado en la figura como ("variante posible"). Los puntos indican que el aminoácido es el mismo que en la secuencia de tipo salvaje.

**La Figura 2** muestra la estructura de un residuo de fragmento Fc 359, un sitio de nueva glicosilación, destacado en ambas cadenas pesadas.

**La Figura 3** muestra CNTO 530 y sus variantes fraccionadas a través de un gel SDS-PAGE (no reducido)

**La Figura 4** muestra un análisis basado en AlphaScreen de lo bien que las dos variantes de constructo MIMETIBODY™ compiten con un mAb biotinilado por la unión a FcRn humano.

**Las Figuras 5A-F** muestran los datos derivados de los trazados de MALDI-TOF-MS de la velocidad de desaparición de los constructos de Fc intactos tras la incubación con MMP-3 humana o de la elastasa de neutrófilos humanos (NE) en el tiempo A-D) CNTO 5303 a CNTO 530, y comparación de CNTO 7363 a CNTO 736, cuando se incubó con MMP-3 o NE. E, F) todas las muestras, incluyendo CNTO 5304 y CNTO 7364, cuando se incubaron con las dos proteasas.

**La Figura 6** muestra las secuencias de aminoácidos de bisagra y dominios de Fc de variantes basadas en IgG1 como en la Fig. 1.

**La Figura 7** es un gráfico que representa la persistencia en suero de CNTO530 vs. CNTO5303 en la sangre de ratones inyectados de ambas moléculas.

### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

#### Abreviaturas

**[0012]** AA = ácido antranílico;  $\alpha$ 1,3GT =  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa; ARD = dificultad respiratoria aguda;  $\beta$ 1,4GT =  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa;  $\alpha$ -2,3ST =  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa; ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; CDC = citotoxicidad dependiente del complemento; CMP-Sia = *N*-ácido acetilneuramínico de monofosfato de citidina; FBS = suero bovino fetal; IgG = inmunoglobulina G; MALDI-TOF-MS = espectrometría de masa de tiempo de vuelo de ionización láser/desorción asistida por matriz; NANA = Isómero de *N*-ácido acetilneuramínico del ácido siálico; NGNA = Isómero de *N*-ácido glicolilneuramínico del ácido siálico; OA = osteoartritis; PNGasa F = péptido *N*-glicosidasa F; HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa; AR = artritis reumatoide; SA = Ácido sináptico; Sia = ácido siálico; SDHB = ácido dihidroxibenzoico que contiene cloruro sódico; UDP-Gal = difosfato de uridina galactosa; UDP-GlcNAc = *N*-acetilglucosamina de difosfato de uridina.

#### Definiciones y Explicación de la Terminología

**[0013]** Los términos "Fc", "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc" como se usa en este documento se refieren a una proteína monomérica, dimérica o heterodimérica que tiene al menos un dominio de CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dimérica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

**[0014]** El término "anticuerpo" pretende abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, las partes especificadas y las variantes de los mismos, incluyendo, sin limitación, anticuerpos miméticos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o Incluyendo, sin limitación, anticuerpos de cadena única, anticuerpos de dominio único, minicuerpos y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión al antígeno que se unen al antígeno diana de interés. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a un antígeno diana o partes de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, Fab (por ejemplo, mediante digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')<sub>2</sub> (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), FACB (por ejemplo, por digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, por técnicas de biología molecular), están abarcados por el término anticuerpo (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, supra).

**[0015]** El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento es una forma específica de Fc que contiene la proteína de fusión que comprende al menos un dominio de unión a ligando que conserva una homología sustancial con al menos una de una cadena pesada o ligera del anticuerpo del dominio variable de al menos una especie de anticuerpo animal.

### Visión de conjunto

**[0016]** La presente invención se impulsó por un interés en la identificación de un nuevo sitio en un dominio de Fc para la PEGilación. Al conocerse técnicas para la conjugación de restos de PEG a los glicanos de las proteínas, lo que proporciona un sitio de direccionamiento específico para la modificación, se intentó el uso de los glicanos naturales en Asn297, sin embargo, debido a la estructura terciaria y cuaternaria de la estructura Fc-dimérica, los glicanos de Fc nativos han demostrado ser insuficientemente accesibles para permitir la conjugación de estructuras de PEG grandes.

**[0017]** Por lo tanto, se consideraron posiciones en el dominio de Fc donde un suplente o sitio de glicosilación N-ligada adicional se podrían introducir por ingeniería en la secuencia de motivo de Asn-xxx-Ser/Thr, conocida como un sitio de reconocimiento para glicosiltransferasas en el retículo endoplásmico de células eucariotas. En la fabricación de tales variantes de glicano para dos construcciones diferentes que comprenden Fc, CNTO 530 (construcción EPO MIMETIBODY™) y CNTO 736 (construcción GLP-1 MIMETIBODY™), se observó que las variantes de glicano no PEGiladas mostraron inesperadamente una resistencia significativamente incrementada a las enzimas proteolíticas.

**[0018]** El cuerpo produce naturalmente proteasas para la digestión y la remodelación de proteínas, a las que también se someten proteínas terapéuticas. En estados de enfermedad no patógenos, tales como RA y otras enfermedades inflamatorias, y cáncer, es bien conocido que un cierto espectro de enzimas proteolíticas está elevado. Además, es bien conocido que las proteasas humanas están asociadas con enfermedades inflamatorias, proliferativas, metastásicas e infecciosas. Las inmunoglobulinas circulantes, y específicamente los anticuerpos de la clase IgG, son las principales proteínas séricas. Se ha apreciado que las proteasas humanas, las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la elastasa de neutrófilos, escinden el polipéptido de cadena pesada de IgG en un residuo único para cada proteasa similar a proteasas bacterianas, tales como endopeptidasa de glutamilo (*Staph. Aureus*) o enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus (Strep. pyogenes)*. Los sitios de escisión en la cadena pesada se agrupan en torno a la región denominada dominio de bisagra, donde se produce el enlace disulfuro entre cadenas de las dos cadenas pesadas. La región por debajo de la bisagra constituye la región Fc y comprende sitios de unión responsables de las funciones efectoras de IgG. En el caso de los microorganismos, la expresión de proteasa es una vía potencial de virulencia adyuvante que permite a los organismos evitar la opsonización (Rooijackers et al., *Microbes and Infection* 7: 476-484, 2005) en cuanto a la liberación proteolítica del dominio de Fc por escisión debajo de la bisagra neutraliza eficazmente las funciones que de otro modo conducirían a la selección y muerte de esa célula patológica. Así, la elaboración de proteasas específicas puede ser representativa de una miríada de estados de enfermedades incluyendo cáncer, inflamación y enfermedades infecciosas. Esta degradación de IgG se aumenta en entornos patológicos *in vivo* tal como se evidencia por la presencia de autoanticuerpos naturales IgG que se unen al dominio de bisagra escindido (Knight et al., 1995; Nasu et al., 1980; Persselin y Stevens, 1985, Temess, et al., 1995, *J Immunol.*, 154: 6446 - 6452). Por lo tanto, el aumento de la resistencia a las proteasas fisiológicamente relevantes podría dar lugar a una semivida *in vivo* prolongada para moléculas que contienen Fc terapéutico, particularmente en entornos ricos en proteasas, que podrían aumentar la eficacia y/o permitir una dosificación menos frecuente.

**[0019]** Una solicitud de patente de propiedad común, WO2009/023457, describe proteasas capaces de degradar IgG y que están asociadas con estados de enfermedad o patológicos, tales como el cáncer, la inflamación y la infección. La información se resume en la Tabla 1 (reproducida más adelante), en la que las "proteinasas de coagulación" incluían F.XIIa, FIXa, F.Xa, trombina y proteína C activada; plasmina era plasminógeno co-incubado con activadores del plasminógeno; tPA, estreptoquinasa y estafilocinasa; "activadores del plasminógeno solos" no tienen plasminógeno; y las MMP eran proteinasas recombinantes obtenidas ya sea como la forma activa o la pro-enzima; Y "Ninguno" indica la ausencia de escisión detectable durante 24 horas. Excepto donde se indica, todas las enzimas eran humanas. Las designaciones de residuo son para el sistema de numeración de la UE para la cadena

pesada completa de anticuerpos IgG1 maduros.

Tabla 1.

Enzima	Fuente	Tipo de proteinasa	Asociación de Enfermedades (Ref)	Sitio recortado	Producto principal
Catepsina G	Gránulos de neutrófilos humanos	Endopeptidasa de serina	Enfisema, FPI, RA (2,3)	Glu <sup>233</sup> -leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc
Catepsina B	"	"			Ninguno
Catepsina D	"	"			Ninguno
Elastasa de neutrófilos (HNE, elastasa de leucocitos, elastasa PMN)	Neutrófilos	"	Amiloidosis, enfisema pulmonar, fibrosis quística, SDRA, AR, invasión tumoral (2,3)	Thr <sup>223</sup> -his <sup>224</sup>	Fab + Fc
Elastasa pancreática			Pancreatitis (3)		
Proteinasa 3 (mioeloblastina)	"	"			Ninguno
Triptasa	Mastocitos	"	Anafilaxis, fibrosis (2)		Ninguno
Quimasa	Mastocitos	"	Inflamación, enfermedades cardiovasculares (2, 3)		Ninguno
Calecreína	"	"			Ninguno
Proteinasas de coagulación	"	"			Ninguno
Plasmina (fibrinolisisina)	"	"	Migración celular (p.ej. tumores) (2) Infección estreptocócica (6)	Lys <sup>223</sup> -Thr <sup>224</sup>	Fab + Fc
Activadores de plasminógeno solos	"	"			Ninguno
Colagenasa intersticial (MMP-1)	Humanos (fibroblastos, condrocitos)	Metaloendopeptidasa	RA, OA, IBD, IPF, aneurismas (1)		Ninguno
Gelatinasa A (MMP - 2)	"Células tumorales, fibroblastos	"	Tumores invasivos (1)	Glu <sup>233</sup> -Leu <sup>234</sup>	F(AB') <sub>2</sub> + Fc
Estromelisinina (MMP - 3)	"Fibroblastos, condrocitos, Osteoclastos, macrófagos	"	RA, OA, placa aterosclerótica, enfermedad de Crohn, colitis, algunos tumores (1, 4)	Glu <sup>233</sup> -Leu <sup>234</sup>	F(AB') <sub>2</sub> + Fc
Matrilisinina (MMP - 7)	Células epiteliales glandulares	"	Tumores invasores (1, 4)	Leu <sup>234</sup> -Leu <sup>235</sup>	F(AB') <sub>2</sub> + Fc
Colagenasa 2 (MMP - 8)	Neutrófilos		Inflamación, RA, OA (1, 4)		Ninguno

(continuación)

Enzima	Fuente	Tipo de proteínasa	Asociación de Enfermedades (Ref)	Sitio recortado	Producto principal
Gelatinasa B (MMP - 9)	"Células normales y tumorales, Monocitos activados, neutrófilos, células T"	"	Inflamación, aneurismas aórticos, ARDS, vómitos RA> OA, infiltrados tumorales de células inflamatorias (1, 4)	Leu <sup>234</sup> - Leu <sup>235</sup>	F(AB') <sub>2</sub> + Fc
Metaloe elastasa de macrófagos (MMP - 12)	Macrófagos	"	Inflamación, destrucción de tejidos cuando se sobreexpresan, aneurismas, placa aterosclerótica (1)	Pro <sup>232</sup> - Glu <sup>233</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc
Catepsina S	"	Cisteína endopeptidasa			Ninguno
Glutamyl endopeptidase I (Glu V8 proteasa)	<i>Staph. Aureus</i>	Endopeptidasa de serina	Staph. Aureus Infección (2)	Glu <sup>233</sup> - Leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc
Enzima degradante de inmunoglobulina de Streptococcus (IdeS)	<i>Strep. Pyogenes</i>	Endopeptidasa de serina	Strep. Pyogenes Infección (5)	Gly <sup>236</sup> - Gly <sup>237</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc
<p>(1) Barrett A. J., Rawlings N. D. y Woessner J. F.(Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2004.</p> <p>(2) Barrett A. J., Rawlings N. D. y Woessner J. F.(Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2004.</p> <p>(3) Powers, J.C., "Proteolytic Enzymes and Disease Treatment" 1982. In: Feeney and Whitaker (eds). Modification of Proteins: Food, Nutritional, and Pharmacological Aspects. Advances in Chemistry Series 198. ACS, Washington, D.C. 1982 pp 347-367.</p> <p>(4) Tchvetverikov I., Ronday H. K., van El B., Kiers G. H., Verzijl N., TeKoppele J. M., Huizinga T. W. J., DeGroot J. y Hannemaaijer R., 2004. MMP Profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. Ann.Rheum.Dis. 63, 881-883.</p> <p>(5) Vincents B., von Pawel-Rammingen U., Björck L. y Abrahamson M., 2004. Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. Biochemistry 43, 15540-15549.</p> <p>(6) Sun H., Ringdahl U., Homeister J.W., Fay W.P., Engleberg N.C., Yang A.Y., Rozek L.S., Wang X., Sjobring U., Ginsburg D., 2004. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. Science. 305, 1283-1286.</p>					

## Funciones oligosacáridas

**[0020]** Oligosacáridos específicos están presentes en las proteínas secretadas como resultado de glicosilación que tiene lugar en el retículo endoplásmico de las células eucarióticas como el procesamiento normal de las proteínas designadas por secuencias de señal para la exportación de la célula. La composición de oligosacáridos añadidos a la proteína se ve afectada por factores tales como la naturaleza de la proteína, la especie de origen de la célula, las condiciones de cultivo y el medio extracelular. La naturaleza del "glicoma" de especie a especie o incluso de individuo a individuo ha sido reconocida durante mucho tiempo como la fuente de epítomos antigénicos, por ejemplo, los grupos sanguíneos humanos. Por lo tanto, la glicosilación de la superficie de la proteína representa un método para alterar el reconocimiento de las proteínas dirigiendo receptores específicos o no específicos para estructuras de glicanos particulares o sacáridos terminales. Oligosacáridos o ligandos para receptores de mamíferos similares a lectinas, tales como las selectinas, por ejemplo proteínas de unión a manosa, L-selectina y P-selectina.

**[0021]** Los glicanos normalmente adjuntos a la Asn 297 del dominio de CH2 en las moléculas de IgG de mamífero actúan para proporcionar estructura terciaria para la Fc, dos cadenas de polipéptidos unidos covalentemente en la región bisagra sobre el dominio de CH2 y por asociación no covalente de los dos dominios de CH3. La IgG

aglicosilada no se une a los receptores Fc ni exhibe las funciones efectoras de ADCC o CDC o se une al complemento Clq. Estudios recientes (Kaneko, 2006 Science 313: 670-673, Shields et al., 2002 J Biol. Chem. 277: 30 26733-26740) han demostrado que el contenido de glicano enlazado con Asn297 también puede afectar a la afinidad de unión de moléculas de IgG a receptores Fc (gamma).

**[0022]** Una preparación de globulina gamma humana, conocida como IVIG, ha sido utilizado como un tratamiento antiinflamatorio general. Estudios recientes en un modelo de artritis inducida por suero murino en el que el tratamiento con altas dosis de IVIG humana suprime la artritis, demostró que la desialilización enzimática previa de IVIG anuló su beneficio terapéutico, mientras que el enriquecimiento para la fracción sialilada de IVIG aumentó su beneficio antiinflamatorio Kaneko, 2006 Science 313: 670 - 673).

**[0023]** Se sabe desde hace tiempo que la propiedad anti-inflamatoria se determina por la porción Fc de la IVIG. Posterior trabajo demostró que la fracción de moléculas de IVIG principalmente responsables para la supresión de inflamación de las articulaciones en un modelo de artritis murino son aquellos con ácido siálico Fc en una vinculación  $\alpha$ -2,6 con galactosa en oposición a aquellos con ácido siálico en vinculación  $\alpha$ -2,3 (Anthony et al., (2008) Science 320: 373). La lectina de ratón, SIGN-R1, expresada en la superficie de los macrófagos esplénicos, es un receptor para fragmentos de Fc sialilados  $\alpha$ 2,6 como es la lectina humana, DC-SIGN expresado en las células dendríticas humanas (Anthony, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 16 de diciembre, 105 (50): 19571 - 8).

**[0024]** Por lo tanto, usando las composiciones de proteína de la presente invención, las composiciones de proteína que tienen estructuras de oligosacáridas especificadas, termini, o contenido pueden sintetizarse a través de la manipulación de la célula huésped y glicoingeniería, o preparada por tratamiento de purificación de pre- o post-proteína, tal como la fracción usando cromatografía de afinidad de lectina o tratamientos enzimáticos o combinaciones de varios métodos. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica tal como se enseñan en la presente memoria o pueden desarrollarse usando métodos conocidos en ingeniería genética, enzimología, fracción proteica, y similares. Estas preparaciones se pueden usar para dirigir receptores específicos cuando se producen en tipos de células, tejidos u órganos seleccionados.

**[0025]** La glicosilación o hiperglicosilación de las proteínas aumenta el volumen hidratado de una proteína y puede añadir carga negativa debido a la presencia de residuos de ácido siálico. Estas alteraciones hacen que las proteínas estén menos sujetas al aclaramiento mediante filtración renal. Por lo tanto, además de la unión a FcRn como medio por el cual el fragmento Fc mejora la semivida de la proteína en la circulación, el aumento de la circunferencia de la proteína producirá un efecto añadido, siempre que la glicosilación adicional no reduzca la unión a FcRn.

### **Método de preparación de las moléculas alteradas que contienen Fc**

**[0026]** Los sitios para la glicosilación adicional se eligieron basándose en el deseo de añadir glicanos unidos a Asn sin afectar la estructura o función Fc. La estructura de IgG4 Fc (1adq) (Corper et al. (1997) Nat Struct Biol. 4: 374) se analizó para identificar sitios potenciales de modificación. Fueron diana las regiones de lazo del dominio CH3 distante del sitio de unión Fc (gamma) R en la bisagra inferior, y distante del sitio de unión FcRn en la región de unión CH2-CH3. Los bucles 359-TKNQVS-364, 382-ESNGQP-387 y 419-EGNVFS-424 contienen residuos que parecen ser susceptibles de modificación. Dentro de estos bucles, los residuos 359, 382 y 419 se identificaron como sitios atractivos para introducir la glicosilación basándose en la exposición a la superficie y basándose en predicciones de que una sustitución de Asn con glicosilación resultante sería estructuralmente compatible. A continuación, se creó un número de motivos de secuencia de N-glicosilación (NXS/T) para estas posiciones y se estimó su potencial para la glicosilación sometiendo las secuencias al servidor NetNGlyc ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc)). Se eliminaron los motivos con una puntuación de 0,5 o menos. Los motivos elegidos para la introducción en las moléculas de ensayo fueron 359NKT y 419NGT (Figura 1). El sitio 382 no se persiguió debido a la consideración de que el nuevo glicano puede apuntar en una dirección que interferiría con la unión de FcRn. Sin embargo, es posible que la introducción de un sitio de glicosilación en el residuo 382 hubiera producido un dominio de Fc completamente funcional.

### **Modificación enzimática de las proteínas que contienen Fc**

**[0027]** Un método para preparar una proteína que contiene Fc con la estructura de glicano específica o el contenido oligosacárido especificado es mediante el tratamiento de la preparación de proteína que contiene Fc con una sacarasa, tal como una fucosidasa o enzima sialidasa, eliminando de este modo los residuos específicos de azúcar, por ejemplo, fucosa o ácidos siálicos. La adición de sacáridos a la región Fc también se puede lograr usando métodos de glicosilación in vitro.

**[0028]** Las glicosiltransferasas naturalmente funcionan para sintetizar oligosacáridos. Producen productos específicos con una excelente geometría estereoquímica y regioquímica. La transferencia de residuos de glicosilo da lugar a la elongación o síntesis de un oligo o polisacárido. Se han descrito varios tipos de glicosiltransferasa, incluyendo sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas y similares. Las glicosiltransferasas que son útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo,  $\alpha$ -sialiltransferasas,  $\alpha$ -glucosiltransferasas,  $\alpha$ -galactosiltransferasas,

$\alpha$ -fucosiltransferasas,  $\alpha$ -manosiltransferasas,  $\alpha$ -xilosiltransferasas,  $\alpha$ -N-acetilhexosaminiltransferasas,  $\beta$ -sialiltransferasas,  $\beta$ -glucosiltransferasa,  $\beta$ -galactosiltransferasas,  $\beta$ -fucosiltransferasas,  $\beta$ -manosiltransferasas,  $\beta$ -xilosiltransferasas, y  $\beta$ -N-acetilhexosaminiltransferasas, tales como los de *Neisseria meningitidis*, u otras fuentes bacterianas, y los de rata, ratón, conejo, vaca, cerdo, de insectos y SOU virales ECR y humanos. Preferiblemente, la glicosiltransferasa es una variante de truncación de la enzima glicosiltransferasa en la que se ha suprimido el dominio de unión a la membrana. Galactosiltransferasas ejemplares incluyen  $\alpha(1,3)$  galactosiltransferasa (EC N° 2.4.1.151, véase, por ejemplo, Dabkowski et al., *Transplant Proc* 25: 2921 (1993) y Yamamoto et al. *Nature* 345: 229-233 (1990)) y  $\alpha(1,4)$  galactosiltransferasa (EC N° 2.4.1.38). Otras glicosiltransferasas se pueden utilizar, tal como una sialiltransferasa.

**[0029]** Una  $\alpha(2,3)$  sialiltransferasa, a menudo referida como la sialiltransferasa, se puede utilizar en la producción de lactosa de sialilo o estructuras de orden superior. Esta enzima transfiere ácido siálico (NeuAc) a partir de CMP-ácido siálico a un residuo de Gal con la formación de una vinculación  $\alpha$  entre los dos sacáridos. La unión (enlace) entre los sacáridos está entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Una  $\alpha(2,3)$  sialiltransferasa ejemplar denominada  $\alpha(2,3)$  sialiltransferasa (E C 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al terminal no reductor Gal de un disacárido o glicósido Gal $\beta$ 1  $\rightarrow$  3Glc. Véase, Van den Eijnden et al., *J. Biol. Chem.*, 256: 3159 (1981), Weinstein et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 13845 (1982) y Wen et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 21011 (1992). Otra  $\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ejemplar (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico a la terminal no reductor Gal del disacárido o glicósido. Véase, Rearick et al., *J. Biol. Chem.*, 254: 4444 (1979) y Gillespie et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 21.004 (1992). Enzimas ejemplares adicionales incluyen Gal $\beta$ -1,4- GlcNAc  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa (Véase, Kurosawa et al. *Eur J. Biochem* 219: 375-381 (1994)).

**[0030]** Otras glucosiltransferasas particularmente útiles en la preparación de los oligosacáridos de la invención son las manosiltransferasas incluyendo  $\alpha(1,2)$  manosiltransferasa,  $\alpha(1,3)$  manosiltransferasa,  $\beta(1,4)$  manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1 y Pmt1. Todavía otras glucosiltransferasas incluyen N-acetilgalactosaminiltransferasas incluyendo  $\alpha(1,3)$  N-acetilgalactosaminiltransferasa,  $\beta(1,4)$  acetilgalactosaminiltransferasas N-(Nagata et al. *J. Biol. Chem* 267: 12082- 12089 (1992) y Smith et al. *J. Biol. Chem.* 269: 15162 (1994)) y el polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa et al. *J. Biol. Chem.* 268: 12609 (1993)). Las N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.101, Hull y otros, *BBRC* 176: 608 (1991)), GnTII y GnTIII (Ihara et al., *J. Biolchem*, 113: 692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al. *J. Biol. Chem.* 268: 15381 (1993)).

**[0031]** Para aquellas realizaciones en las que el método se ha de practicar a escala comercial, puede ser ventajoso inmovilizar la glicosiltransferasa sobre un soporte. Esta inmovilización facilita la eliminación de la enzima del lote de producto y la posterior reutilización de la enzima. La inmovilización de las glicosil-transferasas puede llevarse a cabo, por ejemplo, eliminando de la transferasa su dominio de unión a la membrana, y uniendo en su lugar un dominio de unión a la celulosa. Un experto en la técnica entenderá que pueden usarse otros métodos de inmovilización y se describen en la literatura disponible.

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

**[0032]** El uso de sustrato de azúcar activado, es decir, fosfato de azúcar de los nucleósidos, se puede evitar, ya sea usando una reacción de regeneración simultáneamente con la reacción de glicotransferasa (también conocida como un sistema de reciclaje). Por ejemplo, como se enseña en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 6.030.815, un sistema de reciclado de CMP-ácido siálico utiliza sintetasa de CMP-ácido siálico para reponer CMP-ácido siálico (CMP-NeuAc) ya que reacciona con un aceptor de sialiltransferasa en presencia de un  $\alpha(2,3)$  sialiltransferasa para formar sialilo-sacárido. El sistema de regeneración de CMP-ácido siálico útil en la invención comprende monofosfato de citidina (CMP), un trifosfato de nucleósido (por ejemplo, trifosfato de adenosina (ATP), un donante de fosfato (por ejemplo, fosfoenolpiruvato o fosfato de acetilo), una quinasa (por ejemplo, quinasa de piruvato o quinasa de etilo) capaz de transferir el fosfato desde el donador de fosfato de nucleósidos difosfatos y un monofosfato de quinasa nucleósido (por ejemplo, mioquinasa) capaz de transferir el fosfato terminal desde un nucleósido trifosfato a CMP. La  $\alpha(2, 3)$  sialiltransferasa y sintetasa de CMP-ácido siálico también se pueden ver como parte del sistema de regeneración de CMP-ácido siálico como la eliminación del ácido siálico activado sirve para mantener la velocidad de avance de la síntesis. La síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación utilizando un fagémido que comprende un gen para una enzima de sintetasa de CMP-ácido siálico modificada se describe en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada en el 1 de octubre, 1992.

**[0033]** Un método alternativo de preparación de oligosacáridos es mediante el uso de una glicosiltransferasa y derivados de glicosilo activado como azúcares donantes, obviando la necesidad de nucleótidos de azúcar como azúcares donantes como se describe en la patente de los EE.UU. 5.952.203. Los derivados de glicosilo activado actúan como suplentes a los sustratos naturales, que son nucleótidos de azúcar caros, generalmente

difosfoazúcares de nucleótidos o monofosfoazúcares de nucleótidos en los que el fosfatado de nucleótidos está  $\alpha$ -vinculada a la posición 1 del azúcar.

**[0034]** Derivados de glicósido activados que son útiles incluyen un grupo saliente activado, tal como, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Las realizaciones preferidas de los derivados de glicósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, con fluoruros de glicosilo siendo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo, fluoruro de  $\alpha$ -galactosilo, fluoruro de  $\alpha$ -manosilo, fluoruro de  $\alpha$ -glucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -fucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -xilosilo, fluoruro de  $\alpha$ -sialilo, fluoruro de alfa-N-acetilglucosaminilo, fluoruro de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de  $\beta$ -galactosilo, fluoruro de  $\beta$ -manosilo, fluoruro de  $\beta$ -glucosilo, fluoruro de  $\beta$ -fucosilo, fluoruro de  $\beta$ -xilosilo, fluoruro de beta-sialilo, fluoruro de  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa y fluoruro de  $\beta$ -N-acetilgalactosaminilo son los más preferidos.

**[0035]** Fluoruros de glicosilo pueden prepararse del azúcar libre, acetilando primero el azúcar y luego tratándola con HF/piridina. Fluoruros de glicosilo acetilados pueden desprotegerse por reacción con una base suave (catalítica) en metanol (por ejemplo, NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están disponibles comercialmente. Otros derivados de glicosilo activados se pueden preparar usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, mesilatos de glicosilo se pueden preparar por tratamiento de la forma hemiacetal totalmente bencilada del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos de bencilo.

**[0036]** Un componente adicional de la reacción es una cantidad catalítica de un fosfato de nucleósido o análogo del mismo. Monofosfatos de nucleósidos que son adecuados para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, monofosfato de adenosina (AMP), monofosfato de citidina (CMP), monofosfato de uridina (UMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de inosina (IMP) y monofosfato de timidina (TMP). Trifosfatos de nucleósido adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de citidina (CTP), trifosfato de uridina (UTP), trifosfato de guanosina (GTP), trifosfato de inosina (ITP) y trifosfato de timidina (TTP). Un trifosfato de nucleósido preferido es el UTP. Preferiblemente, el fosfato de nucleósido es un difosfato de nucleósido, por ejemplo, difosfato de adenosina (ADP), difosfato de citidina (CDP), difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP), difosfato de inosina (IDP) y difosfato de timidina ( TDP). Un difosfato de nucleósido preferido es UDP. Como se señaló anteriormente, la presente invención también puede practicarse con un análogo de los fosfatos de nucleósidos. Análogos adecuados incluyen, por ejemplo, sulfatos de nucleósidos y sulfonatos. Todavía otros análogos incluyen fosfatos sencillos, por ejemplo, pirofosfato.

**[0037]** Un procedimiento para la modificación de proteínas recombinantes producidas, en, por ejemplo, células murinas en donde predomina la forma hidroxilada de ácido siálico (NGNA), es para el tratamiento de la proteína con sialidasa, para eliminar NGNA de tipo ácido siálico, seguido de galactosilación enzimática usando el agente reactivo, UDP-Gal y betal, 4 Galtransferasa para producir glicofomas G2 altamente homogéneas. La preparación puede entonces, opcionalmente, tratarse con el reactivo de CMP-NANA y alfa-2,3 sialiltransferasa para dar glicofomas de G2S2 altamente homogéneas.

**[0038]** Para los propósitos de esta invención, sustancialmente homogénea para una glicofoma se entenderá por aproximadamente el 85% o mayor de esa glicofoma y, preferiblemente de aproximadamente 95% o mayor de esa glicofoma.

#### **Proteasas y sensibilidad a la proteasa de los anticuerpos**

**[0039]** La pepsina es auto-activada y activa a un pH bajo ya que es un componente normal del fluido gástrico secretado en el lumen del estómago después de comer. Los bajos niveles del pepsinógeno de enzima precursora se pueden encontrar en el suero, pero, puesto que la activación y la actividad son el ácido dependiente, no es fisiológicamente relevante a los anticuerpos circulantes. La pepsina escinde IgG1 humana entre la leucina<sub>234</sub>-leucina<sub>235</sub> en la bisagra inferior. Este sitio de escisión está aguas abajo desde el centro de bisagra (-C-P-P-C-) que contiene dos residuos de cisteína que enlazan las dos cadenas pesadas mediante enlaces de disulfuro que crean una molécula de F(AB')<sub>2</sub> que es bivalente para la unión del antígeno.

**[0040]** La bisagra inferior y comienzo de la región CH2, P-A-P-E-F/L-L-G-G-P-S-V-F (residuos 5-16 de SEQ ID NO: 1 y 2) comprende sitios de escisión para matrixmetalloproteinases, MMP-3 y MMP-12. La pepsina y MMP-7 también escinden en esta región (P-A-P-E-L\*L-G). Además, un grupo de enzimas fisiológicamente relevantes; elastasa de los neutrófilos (HNE), estromelina (MMP-3) y la elastasa de macrófagos (MMP-12) escinden IgG en varias posiciones para generar F(AB')<sub>2</sub>, sutilmente diferente, Fab y fragmentos de Fc (véase la Tabla 1).

#### **Caracterización biológica de variantes de glicofoma**

**[0041]** Proteínas que contienen Fc pueden compararse para la funcionalidad por varios ensayos in vitro bien conocidos. En particular, la afinidad para los miembros de familia Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII de receptores Fc $\gamma$  es de interés. Estas mediciones se podrían hacer uso de formas solubles recombinantes de los receptores o las formas asociadas a células de los receptores. Además, la afinidad para FcRn, el receptor responsable de la vida media

prolongada circulante de IgG, se puede medir, por ejemplo, mediante BIAcore usando FcRn soluble recombinante. Ensayos funcionales basados en células, tales como ensayos de ADCC y ensayos de CDC, proporciona una visión de las consecuencias funcionales probables de estructuras variantes particulares. En una realización, el ensayo de ADCC está configurado para que las células NK sean la célula efectora primaria, reflejando así los efectos funcionales sobre el receptor de FcγRIIIA. Ensayos de fagocitosis también se pueden usar para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes variantes, así como ensayos que pueden medir las respuestas celulares, tales como superóxido o liberación de mediadores inflamatorios. Modelos in vivo se pueden utilizar además de, por ejemplo, en el caso de la utilización de variantes de anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de células T en ratones, una actividad que depende de los dominios de Fc de acoplamiento de ligandos específicos, tales como Fc y receptores.

### Procesos de producción de proteínas

**[0042]** Diferentes procesos implicados en la producción de proteínas que contienen Fc pueden impactar estructura de oligosacárido Fc. En un caso, las células huésped que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan en presencia de suero, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS) que no se somete previamente a un tratamiento de calor elevado (por ejemplo, 56°C durante 30 minutos). Esto puede resultar en proteína que contiene Fc que no contiene, o contiene cantidades muy bajas de ácido siálico, debido a la presencia natural en el suero de las enzimas de sialidasa activa que pueden eliminar el ácido siálico de las proteínas que contienen Fc secretadas a partir de esas células. En otra realización, las células que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan en presencia de suero que se sometió a un tratamiento térmico elevado, inactivando de esta manera enzimas de sialidasa, o en ausencia de suero u otros componentes del medio que pueden contener enzimas de sialidasa, de tal manera que la proteína que contiene Fc tiene niveles más altos o más bajos de glicosilación o variantes de glicosilación.

**[0043]** En otra realización, las condiciones usadas para purificar y procesar adicionalmente proteínas que contienen Fc se establecen que favorecerá el contenido de glucano óptimo. En una realización, las condiciones producen contenido oligosacárido máximo o mínimo o provocan la transformación del polipéptido que contiene Fc expresado en una glicofoma predominante. Por ejemplo, al ser el ácido siálico un ácido lábil, la exposición prolongada a un entorno de pH bajo, tal como después de la elución de la proteína de una columna de cromatografía o esfuerzos de inactivación viral, puede conducir a una reducción en el contenido de ácido siálico. En otra realización, el material glicosilado se somete a cromatografía usando un material de soporte inmovilizado por lectina que se unirá selectivamente o retardará el paso de proteínas que muestra sacáridos específicos o complejos de oligosacáridos. En el caso de la columna de lectina inmovilizada, el flujo no vinculante (T, por) o la fracción no unida de columna se pueden separar de la fracción unida (B, vinculado), este último recogido mientras que se pasa tampón de elución a través de la columna. También puede ser posible recoger por separado una fracción débilmente unida o la fracción de columna retardada (R, retrasado), por ejemplo, mediante la recopiliación de Fc que contiene proteína que eluye durante continuo lavado de la columna con el tampón de muestra original. Los ejemplos de lectinas que pueden enriquecer para las proteínas que contienen Fc sialiladas o asialiladas son la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que vincula específicamente oligosacáridos con ácido siálico terminal, y la aglutinina de germen de trigo de lectina (WGA), que vincula específicamente oligosacáridos con cualquiera del ácido siálico terminal o N-acetilglucosamina terminal (Glc-NAc). Otro ejemplo es la Ricina I de lectina (RCA), que une oligosacáridos con galactosa terminal. En el último ejemplo, la fracción de flujo pasante no vinculante puede enriquecerse para moléculas que contienen Fc sialilada. Otras lectinas conocidas en la técnica incluyen las proporcionadas por los laboratorios Vector y los laboratorios EY.

### Selección de célula huésped o ingeniería de célula huésped

**[0044]** Tal como se describe en el presente documento, la célula hospedadora elegida para la expresión de la proteína que contiene Fc recombinante o anticuerpo monoclonal es un contribuyente importante a la composición final, incluyendo, sin limitación, la variación en la composición de las fracciones de oligosacáridos que decoran la proteína en el dominio de inmunoglobulina CH2. Así, un aspecto de la invención implica la selección de células huésped apropiadas para el uso y/o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

**[0045]** En una realización en la que se disminuye el contenido de ácido siálico del anticuerpo o de fusión de Fc, la célula huésped es una célula que es naturalmente deficiente o carente de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped se modifica genéticamente para estar desprovista de sialiltransferasas. En una realización adicional, la célula huésped es una línea celular huésped derivada seleccionada para expresar niveles reducidos o indetectables de sialiltransferasas. En aún otra realización, la célula huésped está naturalmente desprovista de, o se modifica genéticamente para estar desprovista de la sintetasa de CMP-ácido siálico, la enzima que cataliza la formación de ácido siálico CMP, que es la fuente de ácido siálico utilizado por sialiltransferasa para transferir ácido siálico al anticuerpo. En una realización relacionada, la célula huésped puede estar naturalmente desprovista de, o está modificada genéticamente para estar desprovista de la sintetasa de ácido pirúvico, la enzima que forma ácido siálico a partir de ácido pirúvico.

**[0046]** En una realización adicional, la célula huésped puede estar naturalmente desprovista de, o está modificada

genéticamente para estar desprovista de galactosiltransferasas, de manera que los anticuerpos expresados en dichas células carecen de galactosa. Sin galactosa, no se adjuntará ácido siálico. En una realización separada, la célula huésped puede, naturalmente, sobreexpresar, o ser modificada genéticamente para sobreexpresar una enzima de sialidasa que elimina el ácido siálico de los anticuerpos durante la producción. Tal enzima de sialidasa puede actuar intracelularmente en anticuerpos antes de que los anticuerpos se secreten en el medio de cultivo y actuar sobre los anticuerpos que ya han sido secretados en el medio y puede contener además una galactasa. Métodos de selección de líneas celulares con glicosilasas alteradas y que expresan glicoproteínas con composiciones de carbohidratos alterados han sido descritos (Ripka y Stanley, 1986. Células Somáticas Mol Gen 12: 51-62; US2004/0132140). Métodos de células huésped de ingeniería para producir anticuerpos con patrones de glicosilación alterados resultantes en una ADCC mejorada se han enseñado en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.602.864, en la que las células huésped albergan un ácido nucleico que codifica al menos una glicosiltransferasa que modifica glicoproteína, específicamente  $\beta$  (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII).

**[0047]** Otros enfoques para la ingeniería genética de las propiedades de glicosilación de una célula huésped mediante la manipulación de la glicosiltransferasa de célula huésped implica la eliminación o supresión de la actividad, como se enseña en EP1,176,195, específicamente, alfa1,6 fucosiltransferasa (producto génico FUT8). Se conocería por un experto en la técnica cómo poner en práctica los métodos de la ingeniería de la célula huésped en condiciones diferentes de los ejemplos específicos citados anteriormente. Además, la célula huésped de ingeniería puede ser de origen mamífero o puede seleccionarse de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, insecto o células vegetales, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada del mismo.

**[0048]** En otra realización, el método de suprimir o eliminar la actividad de la enzima necesaria para fijación de oligosacárido puede seleccionarse del grupo que consiste de silenciamiento de genes, tal como mediante el uso de siRNA, genético knock-out, o la adición de un inhibidor de la enzima, tal como por co-expresión de un anticuerpo intracelular o péptido específico para la enzima que se une y bloquea su actividad enzimática, y otras técnicas de ingeniería genética conocidas. En otra realización, un método para mejorar la expresión o la actividad de una enzima que bloquea sacárido de fijación, o una enzima sacaridasa que elimina los azúcares que ya están unidos, pueden seleccionarse de entre el grupo constituido por: transfecciones con genes de enzimas recombinantes, transfecciones de factores de transcripción que mejoran la síntesis de ARN de la enzima, y las modificaciones genéticas que mejoran la estabilidad del ARN de enzima, todo lo cual lleva a una mayor actividad de las enzimas, tales como sialidasas, que resultan en niveles más bajos de ácido siálico en el producto purificado. En otra realización, los inhibidores enzimáticos específicos se pueden añadir al medio de cultivo celular. Alternativamente, la célula huésped se puede seleccionar de una especie u organismo incapaz de polipéptidos de glicosilación, por ejemplo, una célula procarionta o un organismo, y de la natural o construida *E. coli spp*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp*.

### Anticuerpos

**[0049]** Un anticuerpo descrito en esta solicitud puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, tal como, pero no limitado a, un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, una cabra, o cualquier combinación del mismo e incluye aislado humano, primate, roedor, mamífero, quiméricos, anticuerpos humanizados y/o injertados con CDR, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras porciones especificadas y variantes de las mismas.

**[0050]** Los anticuerpos, proteínas que comprenden Fc, o fragmentos de Fc descritos en este documento se pueden derivar de varias maneras bien conocidas en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos se obtienen convenientemente a partir de hibridomas preparados por inmunización de un ratón u otro animal con los péptidos diana, células o extractos de tejidos. Los anticuerpos así se pueden obtener usando cualquiera de las técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel, et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY (1987-2001); Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Harlow y Lane, anticuerpos, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Colligan, et al., eds, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1997-2001).

**[0051]** Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc o componentes y dominios de los mismos también pueden obtenerse a partir de la selección de bibliotecas de tales dominios o componentes, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Una biblioteca de fagos puede ser creada mediante la inserción de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, tales como a partir de las células B de un animal inmunizado o humano (Smith, G.P. 1985. Science 228: 1315-1317). Bibliotecas de fagos de anticuerpos contienen pares de región de cadena variable pesada (H) y ligera (L) en un fago que permiten la expresión de fragmentos Fv de cadena única o fragmentos Fab (Hoogenboom, et al. 2000, Immunol. Today 21(8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede manipularse para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos adicionales, deseables, humanos monoclonales. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina de cadena pesada (H) y ligera (L) que codifican genes pueden mezclarse al azar (barajado) para crear nuevos pares de HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Además, cualquiera o ambos de los genes de codificación de

cadena H y L pueden mutagenizarse en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente examinarse para capacidades de afinidad y neutralización deseables. Bibliotecas de anticuerpos también pueden crearse sintéticamente mediante la selección de una o más secuencias de marco humanas y la introducción de colecciones de casetes de CDR derivadas de repertorios de anticuerpos humanos o mediante la variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13: 598-602). Las posiciones de diversidad no se limitan a CDR, pero también pueden incluir los segmentos de marco de las regiones variables o pueden incluir otras que regiones variables de anticuerpos, tales como péptidos. Otras bibliotecas de componentes de unión a diana que puede incluir otras que las regiones variables de anticuerpos son de presentación en ribosomas, presentación en levadura, y muestras bacterianas. Presentación en ribosomas es un método de la traducción de ARNm en sus proteínas cognadas, manteniendo la proteína unida a la ARN. La secuencia de codificación de ácido nucleico se recupera por RT-PCR (Mattheakis, LC et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 9022). La presentación en levadura se basa en la construcción de proteínas de fusión del receptor de adhesión de levadura alfa aglutinina asociada a membrana, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo de apareamiento (Broder, et al. 1997. Nature Biotechnology, 15: 553-7). La presentación bacteriana se basa en la fusión de la diana a las proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o pared celular (Chen y Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79: 496-503). En comparación con la tecnología de hibridoma, fago y otros métodos de presentación de anticuerpos dan la posibilidad de manipular la selección contra el antígeno diana in vitro y sin la limitación de la posibilidad de efectos de acogida en el antígeno o viceversa.

[0052] En la presente memoria también se describen ácidos nucleicos que codifican las composiciones como polinucleótidos aislados o como porciones de los vectores de expresión que incluyen vectores compatibles con la expresión procarionota, eucariota o filamentosa de fago, de la secreción y/o la visualización de las composiciones o mutágenos dirigidos de los mismos.

#### Uso de las moléculas que contienen Fc

[0053] Las composiciones (anticuerpo, fusiones Fc, fragmentos de Fc) generadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente pueden usarse para diagnosticar, tratar, detectar o modular la enfermedad humana o patologías específicas en las células, tejidos, órganos, fluido, o, generalmente, una huesped. Tal como se describe en el presente documento, la modificación de la glicosilación de la porción Fc de un anticuerpo, proteína de fusión de Fc, o un fragmento de Fc para resistir la digestión proteolítica por proteasas conocidas por estar presentes en un fluido, compartimiento, tejido u órgano que es el objetivo del tratamiento puede utilizarse para producir moléculas terapéuticas; estas moléculas pueden conservar sus propiedades de direccionamiento originales y serán menos propensas a la degradación por estas proteasas.

[0054] La proteasa, la actividad de escisión de la cual se ha de resistir, se selecciona entre el grupo constituido por pepsina, plasmina, tripsina, quimotripsina, una metaloproteinasa de matriz, una endopeptidasa de serina, y una proteasa de cisteína, que surge desde la huesped o un patógeno que puede ser un parásito, una bacteria o un virus. En una realización específica, la proteasa es una metaloproteinasa de matriz seleccionada del grupo que consiste de la gelatinasa A (MMP2, gelatinasa B (MMP-9), la metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7), estromelina (MMP-3), y macrófagos de elastasa (MMP-12). Las modificaciones para alteración de la glicosilación de la porción de Fc de la molécula o molécula de Fc (usando la numeración de la UE), se pueden seleccionar de la eliminación de un sitio de glicosilación en el dominio de CH2 (sustitución de Asn 297), adición de un sitio de glicosilación ligada a N en el dominio CH3 sustituyendo un Asn en 359 y un Thr en 361, la adición de un sitio de glicosilación ligada a N en el dominio CH3 sustituyendo un Asn en 382 y un Thr en 384, y la adición de un sitio de glicosilación ligada a N en el dominio CH3 sustituyendo un Asn en 419 y un Thr en 421. Se espera que la adición de sitios de glicosilación al dominio CH3 aumente el volumen de hidratación de la molécula resultante y aumente la persistencia en el cuerpo .

[0055] Las enfermedades o patologías que pueden ser susceptibles de tratamiento usando una composición proporcionada por la invención incluyen, pero no se limitan a: cáncer o enfermedad proliferativa, enfermedades inflamatorias o reumáticas, trastornos autoinmunes, trastornos neurológicos, fibrosis, enfermedad cardiovascular, dermatológica y las enfermedades infecciosas, y las condiciones resultantes de quemaduras o lesiones.

[0056] El cáncer o trastornos proliferativos que son susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención se seleccionan entre tumores sólidos, tumores metastásicos, tumores líquidos, y tumores benignos, tales como linfomas, linfoblástica o leucemia mielógena, (ALL), células B, células T o FAB ALL, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplástico (MDS), una enfermedad linfoproliferativa, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Castleman, una linfoma maligna, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma de células renales, cáncer de mama, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, sarcomas, melanoma maligno, especialmente melanoma metastásico, y hemangioma.

[0057] Enfermedades inflamatorias o mediadas por el sistema inmune que son susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención se seleccionan de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, inicio sistémico

artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías y placa artroscópica, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, uveítis, neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica, granulomatosis, sarcoidosis, orquitis, enfermedades alérgica y atópica, asma y asma atópico de Wegener, rinitis alérgica, eczema, dermatitis de contacto alérgico, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

**[0058]** Otras enfermedades o condiciones que son susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención son el pénfigo, esclerodermia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones de bacterias gram positivas o gram negativos, infecciones víricas tales como la gripe y el VIH, la infección por parásitos tales como malaria o la leishmaniasis, la lepra, la encefalitis, la candidiasis, la amiloidosis, enfermedad de Alzheimer, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico y hemorragia.

**[0059]** Tal como se especifica ejemplarmente en este documento, la adición de un glicano N-ligado en el dominio CH3 de una región Fc (mediante la sustitución de un residuo Asn en 359 y un residuo de Thr en 361 (numeración UE)) un compuesto que es una de proteína péptido de fusión de Fc se hace menos sensible a una metaloproteínasa de matriz (MMP-3) y una endopeptidasa de serina (NE), mientras que se mantiene la afinidad de unión a FcRn de la molécula y la actividad ADCC/CDC.

**[0060]** Mientras que se ha descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

#### **EJEMPLO 1. CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES DE GLICOSILACIÓN FC**

**[0061]** La experimentación se realizó sobre la fusión Fc EMP-1 (CNTO530) descrita como un constructo EPO MIMETIBODY™ (fusión Fc) en la patente de los EE.UU. 7.393.662 (SEQ ID NO: 88) y un constructo GLP-1 MIMETIBODY™ (fusión Fc) (CNTO736) descrito en el documento WO/05097175. Ambas construcciones contienen una región Fc derivada de un anticuerpo de IgG4 humana como se muestra en la Fig. 1.

##### Variantes CNTO 530

**[0062]** El plásmido que codifica CNTO530, p2630, se usó como material de partida para preparar NEM2631 utilizando métodos estándar de PCR y de clonación recombinantes. Para introducir las sustituciones T359N/N361T en constructo EPO MIMETIBODY™ CNTO 530, un fragmento de restricción de codificación de CH3 se aisló de plásmido p3051 de NEM 2631 T359N/N361T y se clonó en el lugar del fragmento correspondiente en CNTO 530 codificador de plásmido p2630. El plásmido resultante, P3201, codificó la proteína CNTO 530 T359N/N361T, denominada en este documento CNTO 5303 (véase la Figura 2 y Tabla 1).

**[0063]** Para preparar una variante CNTO 530 que tiene las mismas sustituciones T359N/N361T pero que carecen de la glicosilación de Fc nativa en la posición 297, la porción apropiada del plásmido P3201 se amplificó por PCR con los oligonucleótidos mutagénicos y se clonó para resultar en una sustitución de codón T299N (es decir, se ha cambiado de <sup>297</sup>NST<sub>299</sub> a <sup>297</sup>NSN<sub>299</sub>). El plásmido resultante era p3576 que codifica la proteína CNTO 530 T359N/N361T/T299N, denominado en el presente documento CNTO 5304.

##### Variantes CNTO 736

**[0064]** Para introducir las sustituciones de T359N/N361T en CNTO 736, un fragmento de restricción de codificación de CH3 se aisló de NEM 2631 T359N/p3051 plásmido N361T y se clonó en el lugar del fragmento correspondiente en plásmido p2538 que codifica CNTO 736. El plásmido resultante era p3349 que codifica CNTO 736 T359N/N361T, denominado en el presente documento CNTO 7363 (Tabla 1).

**[0065]** Para preparar una variante CNTO 736 que tiene las mismas sustituciones T359N/N361T pero que carecen de la glicosilación de Fc nativa en la posición 297, la porción apropiada del plásmido p3349 se amplificó por PCR y se clonó para resultar en una sustitución de codón de T299N. El plásmido resultante era p3577 que codifica la proteína CNTO 736 T359N/Ne361T/T299N, denominado en el presente documento CNTO 7364.

Tabla 1.

Plásmido	Código	Descripción	Anfitrión	Código	mg/L*
p3201	CNTO 5303	CNTO 530 T359N/N361T	CHO	C1514A	28
p3576	CNTO 5304	CNTO 530 T359N/N361T/T299N	NS0	C1670A	20
p3349	CNTO 7363	CNTO 736 T359N/N361T	NS0	C1528A	5-8
p3577	CNTO 7364	CNTO 736 T359N/N361T/T299N	NS0	C1671A	5-8

\* niveles de producción observados a partir de células transfectadas

**Expresión y purificación.** Células CHO-K1SV (C1013A) fueron transfectadas de forma estable con el plásmido P3201 codificador de CNTO 5303, resultando en el aislamiento de línea celular C1514A productora de CNTO 5303. Células de ratón NS0 se transfectaron de forma estable con los plásmidos descritos anteriormente que codifican CNTO 5304, CNTO 7363, y CNTO 7364, resultando en el aislamiento de líneas celulares transfectadas C1670A, C1528A, y C1671A, respectivamente (Tabla 1). Todos las cuatro variantes de constructo MIMETIBODY™ se purificaron a partir del sobrenadante de células transfectadas por cromatografía de proteína estándar A. Dado que la proteína A y FcRn se unen ambos en la unión CH2-CH3 del dominio de Fc, la purificación con éxito utilizando columnas de proteína A sugirió que los nuevos sitios de glicosilación pueden no afectar a la unión a FcRn (véase abajo).

## Ejemplo 2. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE GLICOSILACIÓN DE Fc

**[0066]** Una serie de pruebas de bioactividad, analíticas, y biofísicas se realizaron en las construcciones expresadas del Ejemplo 1.

**[0067]** Los análisis MALDI-TOF-MS se realizaron para caracterizar las estructuras de glicano de las variantes de constructo MIMETIBODY™ y para establecer la proporción de las cadenas pesadas se glicosilaron en el nuevo sitio.

**[0068]** Los análisis MALDI-TOF-MS de constructos MIMETIBODY™ intactos indicó que las muestras de CNTO 5303, CNTO 5304, CNTO 7363, y CNTO 7364 eran 75 - 95% ocupados con glicano en el nuevo sitio. El análisis de glicanos de estas muestras mostró que eran más heterogéneos que glicanos de constructo de CNTO 530 y CNTO 736 MIMETIBODY™, con glicanos en la posición 359 que contienen estructuras bi-, tri- y tetra-antennarias. Los glicanos nativos Fc en la posición 297 en CNTO 5303 y CNTO 7363 eran de las mismas estructuras que los glicanos de Fc nativo en CNTO 530 y CNTO 736, respectivamente, siendo la única diferencia observada una galactosilación algo mayor en el constructo de MIMETIBODY™ original (por ejemplo, alrededor de 50% G0 para CNTO 530 v. aproximadamente 70% para CNTO 5303).

### Tamaño y movilidad se analizó mediante SDS-PAGE

**[0069]** CNTO 530, CNTO 5303, y CNTO 5304 purificadas se analizaron por SDS-PAGE mediante la carga de 1 ug/carril en un gel de gradiente de 4-12% de 1,0 mm de espesor BisTris bajo condiciones no reductoras, y ejecutando el fraccionamiento en tampón de ejecución MOPS SDS a 200 V durante 50 min. El gel se tiñó con coomassie G250 (SimplyBlue Safe Stain, Invitrogen), y las imágenes resultantes capturadas utilizando un sistema de imagen Alphamager 2200 (Alpha Innotech) (Fig. 4).

**[0070]** Las migraciones observadas en el gel SDS estaban en línea con las expectativas, es decir, CNTO 5303 con un total de 4 sitios de N-glicosilación migraron más lentamente, el peso molecular aparente aumentó en 3-4 kDa, que CNTO 530 y CNTO 5304 con 2 sitios de N-glicosilación. CNTO 5304 pareció migrar más lentamente que CNTO 530 a pesar de tener el mismo número de sitios de glicosilación. Esto se debe al nuevo sitio de glicosilación en CNTO 5304 que tiene, con respecto a la glicosilación nativa en CNTO 530, un mayor nivel de galactosilación y sialilación, así como más estructuras tri-antennarias y tetra-antennarias. Las estimaciones de peso molecular son 57,5, 61,5, y 59,5 kDa para CNTO 530, CNTO 5303, y CNTO 5304, respectivamente.

### Bioactividad evaluada por análisis de unión a FcRn.

**[0071]** Al ser uno de los factores en la elección de dónde introducir la nueva glicosilación un deseo de evitar la región de unión FcRn, la unión a FcRn por CNTO 5303 se comparó con CNTO 530 usando AlphaScreen. Las dos muestras de constructo MIMETIBODY™ se dializaron primero durante la noche a 4°C en tampón de ensayo de pH 6,0 (0,05M de MES, 0,025% de BSA, 0,001% de Tween 20, pH 6,0) usando las unidades de diálisis Slide-A-Lyzer MINI (10K MWCO; Thermo Scientific (Pierce)) según las instrucciones del paquete. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por DO<sub>280</sub>. Los siguientes componentes fueron co-incubados en una placa de ensayo de poliestireno blanco, de fondo plano, de 96 pocillos, de media área y no vinculante, con la mezcla durante 1 hora a

temperatura ambiente: IgG1 mAb biotinilada humana (CNTO 6234; concentración final de 4 µg/ml), las muestras de ensayo diluidas en serie, FcRn humana etiquetada por polihistidina (concentración final de 8 µg/ml), perlas aceptoras de quelato de níquel AlphaScreen (concentración final de 100 µg/ml), y perlas donantes recubiertas con estreptavidina AlphaScreen (dilución final de 1: 250). Todos los materiales se diluyeron usando tampón de ensayo como se describe anteriormente. Después de la incubación, las placas se leyeron en el instrumento EnVision usando el protocolo AlphaScreen. Los resultados (Fig. 5) mostraron que FcRn vinculado por CNTO 5303 con una afinidad similar ( $K_D$  solamente 2 veces más débil que CNTO 530), indicando que la vinculación de FcRn se conservó en CNTO 5303.

#### 10 Evaluación de la sensibilidad de proteasa.

15 **[0072]** Las moléculas de MIMETIBODY™ purificadas se evaluaron a continuación por su sensibilidad con respecto a dos proteasas humanas, metaloproteinasa-3 de matriz recombinante (MMP-3) y la elastasa de neutrófilos (NE). La MMP-3, que se cree que se escinde después de la secuencia de <sup>228</sup>SCPAP en la bisagra inferior, se había preparado a Centocor por expresión transitoria en células HEK como pro-MMP-3 etiquetada por poliHis, purificación por columna de afinidad Talon, y congelado en partes alícuotas. NE humana, que normalmente escinde principalmente después de la secuencia de bisagra superior <sup>220</sup>CDKT, pero también puede escindir en un sitio secundario en la bisagra inferior (véase más adelante), se obtuvo de Athens Research and Technologies (Athens, GA).

#### 20 Sensibilidad de la proteasa

25 **[0073]** MMP-3. MMP-3 congelada se descongeló, y después se activa por incubación a 55°C durante 25 minutos antes de realizar digestiones de MMP-3. Muestras de constructo MIMETIBODY™ purificadas al ~ 1 mg/ml se trataron a 37°C con MMP3 activado (1:50, en peso) en 20 mM de tampón de Tris-HCl, pH 7,0, que contiene cloruro cálcico de 2 mM. Alícuotas (~ 2 µl) se retiraron a intervalos fijos de tiempo (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) y se mezclaron inmediatamente con 2 µl de solución de matriz (solución matriz se preparó disolviendo 10 de mg ácido sinápico en 1,0 ml 50% de acetonitrilo en agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%). Dos µl de esta solución se cargó en la placa diana MALDI y se dejó secar al aire antes del análisis de espectrometría de masas descrito a continuación.

35 **[0074]** *Elastasa de neutrófilos.* Debido a que las partes de péptido N-terminales de los constructos de MIMETIBODY™ eran extremadamente sensibles a la digestión NE (complicando así cuantificaciones de moléculas intactas e interfiriendo con el foco en la resistencia de la bisagra-Fc), y debido a que se observó que un sitio de escisión NE secundario existía en algún lugar en la parte inferior la región bisagra, especialmente en las IgG no glicosiladas, fragmentos de Fc generados por papaína se prepararon primero de cada muestra de constructo de MIMETIBODY™. Esos fragmentos de Fc de cada constructo de MIMETIBODY™, mientras que estaban a una concentración de ~ 1 mg/ml, se trataron a 37°C con NE (1:50, en peso) en 20 mM de tampón de Tris-HCl, pH 7,0. Alícuotas (~ 2 µl) fueron retiradas a intervalos fijos de tiempo (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) y se mezclaron inmediatamente con 2 µl de solución de matriz (la solución de matriz se preparó por disolución de 10 mg de ácido sinápico en 1,0 ml 50% de acetonitrilo en agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%). Dos µl de esta solución se cargó en la placa diana MALDI y se dejó secar al aire antes del análisis espec. de masa.

45 **[0075]** Los fragmentos de IgG e IgG en la digestión proteolítica se analizaron mediante analysis MALDI-TOF-MS. Los análisis MALDI-TOF-MS se llevaron a cabo utilizando una estación de trabajo Voyager DE Biospectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA) en modo de ión lineal o de reflectrón positivo ( $[M + H]^+$ ) con extracción retardada. El instrumento se calibró externamente con un kit de calibración de proteína (Sigma). Los resultados mostraron que la presencia de N-glicosilación en Asn359 confirió claramente mayor resistencia tanto a la MMP-3 (Figuras 5A, 5C, 5E) como NE (Figuras 5B, 5D, 5F), dos proteasas que escinden estos sustratos en la región bisagra inferior. Después de una incubación de 8 horas con MMP-3, menos de 20% de CNTO 530 originales permanecieron intactas, mientras que más del 60% de CNTO 5303 permaneció intacta. Se observaron resultados similares con CNTO 7363 y CNTO 736. Después de una incubación de 8 horas con NE, menos del 10% de CNTO 530 Fc estaba intacto, mientras que el 50% de CNTO 5303 Fc estaba intacta - y resultados similares se observaron de nuevo con fragmentos de Fc de CNTO 7363 y CNTO 736. Las variantes CNTO 5304 y CNTO 7364 que tenían la nueva glicosilación en la posición 359, pero carecían de la glicosilación Fc nativa en 297 mostraron sensibilidad intermedia a MMP-3 (Figura 5E), pero sensibilidad marcadamente mayor a la NE (Figura 5F). Queda por determinar en qué medida la sensibilidad NE está directamente influenciada por la falta de glicosilación Fc nativa o indirectamente por el plegado incorrecto resultante del dominio de Fc superior en ausencia de glicosilación nativa. Debido a que tanto MMP-3 como NE se escinden en el entorno de la región bisagra de constructo MIMETIBODY™, el nuevo sitio de glicosilación introducido lejos de los sitios de escisión (véase la Figura 2) aparentemente tiene efectos alostéricos en la conformación de proteínas, como se observa con algunas sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, no se puede descartar que sustituciones T359N o N361T podrían dar lugar a tal efecto alostérico.

#### 65 **EJEMPLO 3. COMPORTAMIENTO IN VIVO DE LAS VARIANTES DE GLICOSILACIÓN Fc**

**[0076]** En este estudio, la farmacocinética de las variantes de glicosilación de CNTO530 se compararon en ratones.

Ratones Balb/c femeninos sanos normales, 8-12 semanas de edad (aproximadamente 18-22 g) de Charles Rivers Laboratories (Raleigh, NC) fueron aleatorizados en peso y alojados en grupo (4 ratones/jaula) en jaulas de plástico de filtro en la parte superior y se les suministró comida comercial para roedores y agua acidificada *ad lib*. Los ratones (4 por artículo de ensayo) se inyectaron por vía intraperitoneal con una dosis de 10 ml/kg de cualquiera de CNTO 530 o CNTO 5303 formulada en PBS de Dulbecco a 0,1 mg/ml a fin de lograr una dosis de 1 mg/kg.

**[0077]** Se recogieron muestras de sangre en los días 2, 7, 16, 26, y 35 por sangrados retro-orbitales de serie de cada ratón anestesiado por CO<sub>2</sub> durante los primeros 26 días. Muestras de sangre terminales se recogieron en el día 35 mediante punción cardiaca de ratones anestesiados por CO<sub>2</sub>. Todas las muestras fueron marcadas en relación con el animal del que se deriva de modo que los análisis de transcurso de tiempo podrían llevarse a cabo en cada animal individual.

**[0078]** Se permitió que todas las muestras de sangre se mantuvieran en reposo a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, pero no más de 1 hora, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y el suero se separó. Las muestras de suero se almacenaron a -20°C hasta el final del estudio, momento en el que se analizaron en conjunto todas las muestras.

**[0079]** Se analizaron muestras de suero de todos los ratones para Fc humano por una ELISA estándar que implica el revestimiento de placas EIA de 96 pocillos con el fragmento IgG Fc anti-humano de cabra policlonal, incubando diluciones variables de las muestras de suero, y detectando IgG humana vinculada con IgG anti-humana de cabra policlonal conjugada por HRP seguida de la adición de los sustratos de color apropiados. Cantidades tituladas de artículo de prueba disparadas en sueros normales fueron utilizadas para establecer una curva estándar para los propósitos de cuantificación.

**[0080]** Las concentraciones de Fc humana determinadas para cada muestra de suero se normalizaron a los niveles séricos de día 2 y se representaron. Los resultados revelaron que el perfil farmacocinético de la variante de glicosilación CNTO 5303 era esencialmente indistinguible de la de CNTO 530, lo que indica que los nuevos glicanos no tenían un efecto perjudicial sobre la vida media en ratones normales sanos (Fig. 7).

**Reivindicaciones**

- 5 **1.** Una molécula que contiene Fc que comprende una secuencia de aminoácido de dominio Fc de anticuerpo modificado con los sitios de N-glicosilación en los extremos de las estructuras de bucle en el dominio CH3, en el que la molécula que contiene Fc ha aumentado la resistencia a la proteasa, en comparación con las moléculas que contienen Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio de Fc de anticuerpo no modificado análogo.
- 10 **2.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que:
- (i) el dominio de Fc es de cualquiera de una molécula IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4; o
- (ii) la molécula que contiene Fc es un anticuerpo o proteína de fusión Fc.
- 15 **3.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteasa se selecciona de entre el grupo constituido por pepsina, plasmina, tripsina, quimotripsina, una metaloproteínasa de matriz, una endopeptidasa de serina, y una proteasa de cisteína, opcionalmente en la que la proteasa es una matriz de metaloproteínasa seleccionada del grupo que consiste de la gelatinasa A (MMP2), gelatinasa B (MMP-9), metaloproteínasa de matriz 7 (MMP-7), estromelisina (MMP-3), y elastasa de macrófagos (MMP-12).
- 20 **4.** La molécula que contiene Fc de cualquier reivindicación precedente, en la que el dominio de Fc exhibe sitios de N-glicosilación correlativos a la numeración de UE en al menos uno de los residuos 359, 382, y 419.
- 5.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 4, en donde:
- (i) el dominio de Fc exhibe sitios de N-glicosilación correlativos a la numeración de UE en los residuos 359, 382, y 419 del dominio de Fc; o
- (ii) el dominio de Fc exhibe sitios de N-glicosilación correlativos a la numeración de UE en los residuos 359, 382, y 419 del dominio de Fc, y un sitio de N-glicosilación en el residuo 297 del dominio de Fc se elimina, opcionalmente en el que el residuo 299 se cambia de Thr a Asn, residuo 359 se cambia de Thr a Asn, residuo 361 se cambia de Asn a Thr, residuo 419 se cambia de Thr a Asn, y residuo 421 se cambia de Asn a Thr.
- 30 **6.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 4, en la que el dominio de Fc tiene un cambio de tipo salvaje en al menos uno de los residuos 359, 361, 419, y 421.
- 7.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 6, en donde:
- (i) el residuo 359 se cambia de Thr a Asn y residuo 361 se cambia de Asn a Thr, y/o el residuo 419 se cambia de Thr a Asn y el residuo 421 se cambia de Asn a Thr; o
- (ii) el dominio de Fc tiene un cambio de tipo salvaje en los residuos 359, 361, 419, y 421, opcionalmente en el que residuo 359 se cambia de Thr a Asn, residuo 361 se cambia de Asn a Thr, residuo 419 se cambia de Thr a Asn, y residuo 421 se cambia de Asn a Thr.
- 40 **8.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1, en el que correlativo a la numeración de UE al menos uno de los residuos 228, 234, y 235 se altera en la región de bisagra.
- 45 **9.** Una molécula que contiene Fc con mayor resistencia a la proteasa según la reivindicación 1, que comprende un dominio de Fc de anticuerpo con sitios de N-glicosilación correlativos a la numeración de UE en los residuos 359, 382, y 419 del dominio de Fc y un sitio de N-glicosilación en el residuo 297 del dominio de Fc se elimina, en el que el dominio de Fc tiene un cambio de tipo salvaje en los residuos 299, 359, 361, 419, y 421.
- 50 **10.** La molécula que contiene Fc de la reivindicación 9, en la que correlativo a la numeración de UE al menos uno de los residuos 228, 234, y 235 se altera en la región bisagra.
- 11.** La molécula que contiene Fc de cualquier reivindicación precedente, para su uso en un método para tratar una enfermedad asociada con la presencia de niveles elevados de proteasas.
- 55 **12.** Un método para aumentar la resistencia de una proteína que contiene Fc a la escisión por una proteasa, que comprende la adición de sitios de N-glicosilación de la proteína que contiene Fc correlativa a la numeración de UE en al menos una de las posiciones 359, 382, y 419.
- 60 **13.** El método de la reivindicación 12, que comprende la adición de sitios de N-glicosilación de la proteína que contiene Fc correlativa a la numeración de UE en las posiciones 359, 382, y 419, que opcionalmente comprende además la eliminación del sitio de N-glicosilación correlativo a la numeración de UE en la posición 297.
- 65 **14.** El método de la reivindicación 12, que comprende además la alteración del tipo salvaje correlativo a la numeración EU al menos uno de los residuos 228, 234, y 235 en la región bisagra.

Figura 1

	2	2			
	2	3			
	8	5			
IgG4 de tipo silvestre	<u>CPSCPAPEFL</u>	<u>GGPSVFLFPP</u>	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSQEDPEVQF
CNTO 530/736	..P.....AA	.....	.....	.....	.....
CNTO 5303/7363	..P.....AA	.....	.....	.....	.....
CNTO 5304/7364	..P.....AA	.....	.....	.....	.....
NEM 3052	.....	.....	.....	.....	.....
			2 2		
			9 9		
			7 9		
IgG4 de tipo silvestre	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	FNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
CNTO 530/736	.....	.....	.....	.....	.....
CNTO 5303/7363	.....	.....	.....	.....	.....
CNTO 5304/7364	.....	.....	..N.....	.....	.....
NEM 3052	.....	.....	.....	.....	.....
				3 3	
				5 6	
				9 1	
IgG4 de tipo silvestre	KGLPSSIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSQ	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS
CNTO 530/736	.....	.....	.....	.....	.....
CNTO 5303/7363	.....	.....	.....	..N.T...	.....
CNTO 5304/7364	.....	.....	.....	..N.T...	.....
NEM 3052	.....	.....	.....	.....	.....
	3				4 4
	8				1 2
	2				9 1
IgG4 de tipo silvestre	DIAVEWESNG	QPENNYKTPP	PVLDSGGSFF	LYSRLTVDKS	RWQEGNVFSC
CNTO 530/736	.....	.....	.....	.....	.....
CNTO 5303/7363	.....	.....	.....	.....	.....
CNTO 5304/7364	.....	.....	.....	.....	.....
NEM 3052	.....	.....	.....	.....	..N.T...
possible variant	.....N.T.	.....	.....	.....	.....
IgG4 de tipo silvestre	SVMHEALHNNH	YTQKSLSLSL	GK		
CNTO 530/736	.....	.....	..		
CNTO 5303/7363	.....	.....	..		
CNTO 5304/7364	.....	.....	..		
NEM 3052	.....	.....	..		

**Figura 2**

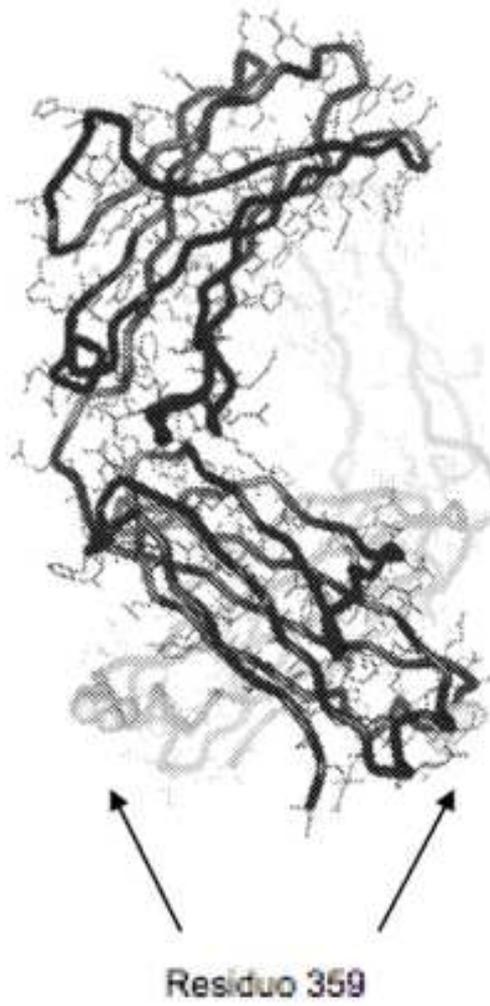


Figura 3

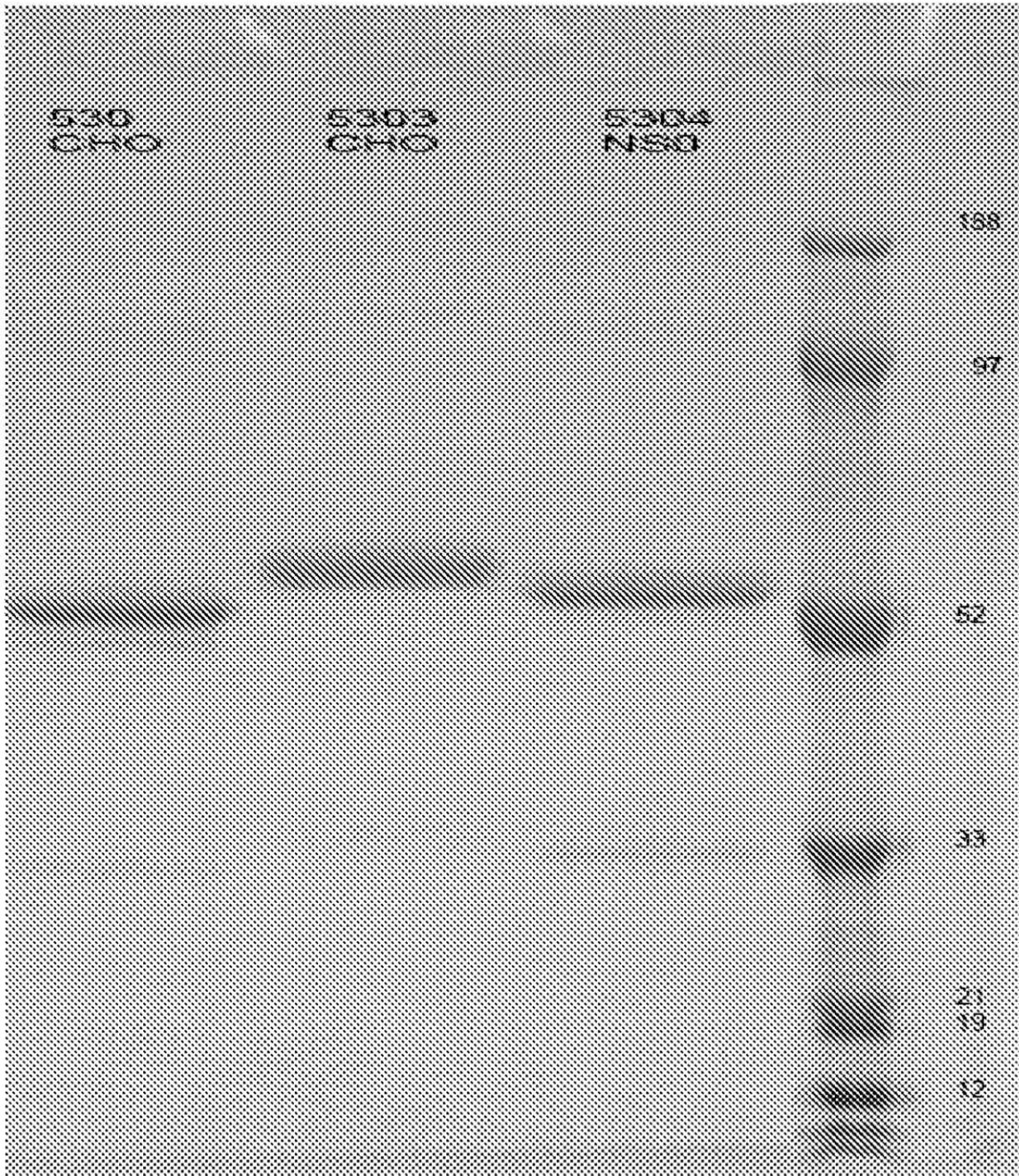


Figura 4

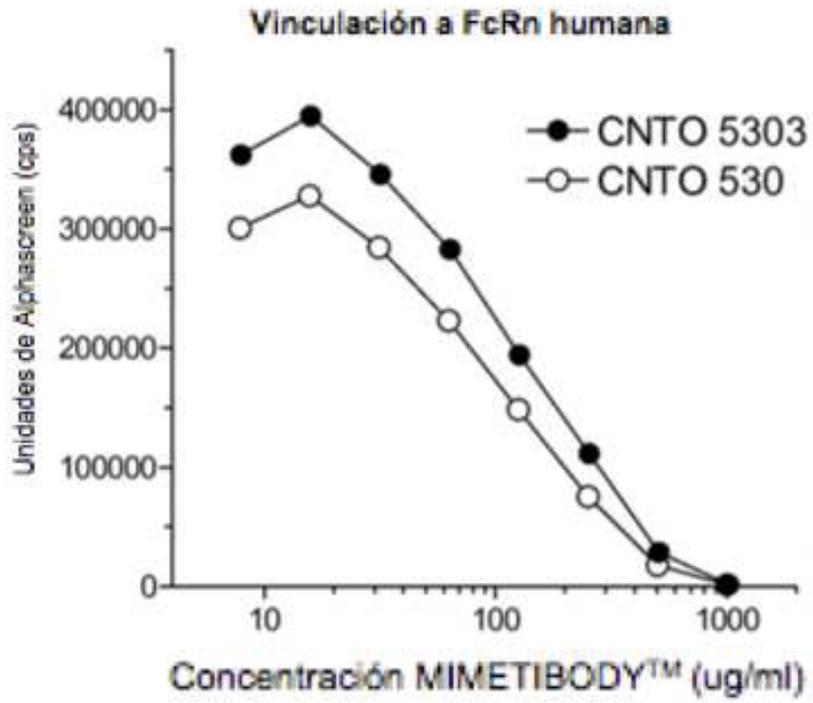


Figura 5

Figura 5A

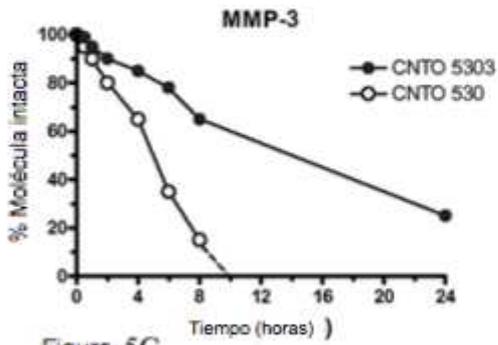


Figura 5B

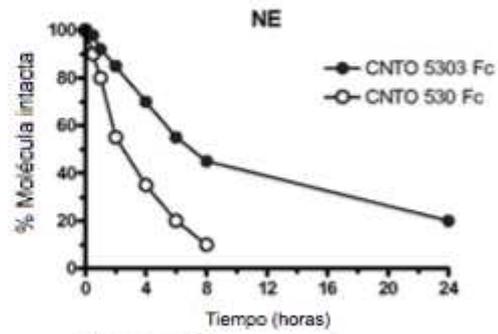


Figura 5C

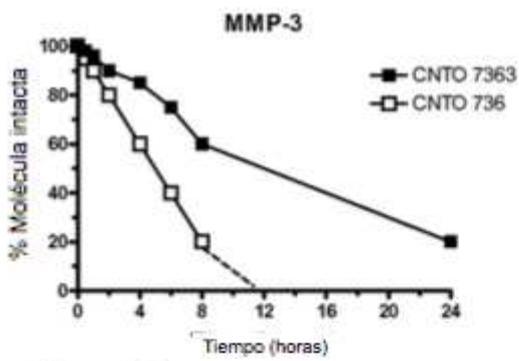


Figura 5D

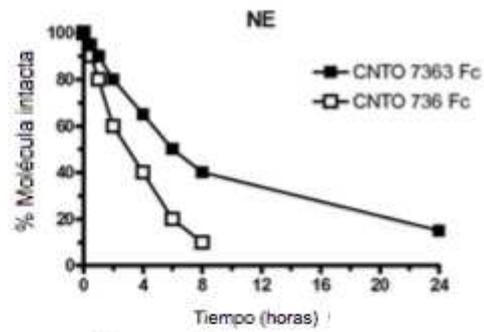


Figura 5E

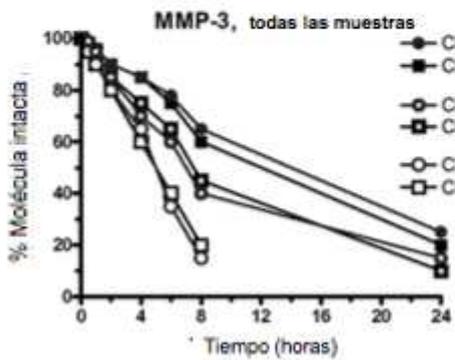


Figura 5F

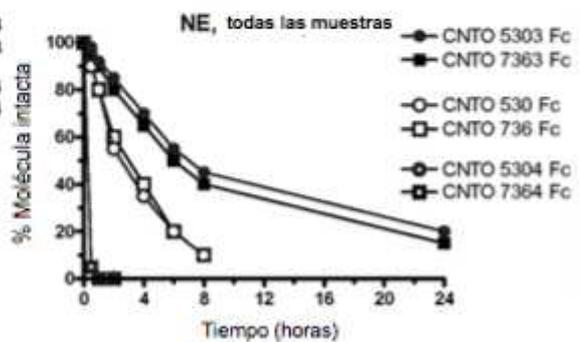


Figura 6

	2	2			
	2	3			
	8	5			
IgG1 de tipo silvestre	<u>CPPCPAPELL</u>	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
variant 1	..P.....AA	.....	.....	.....	.....
variant 2	..P.....AA	.....	.....	.....	.....
variant 3	.....	.....	.....	.....	.....
			2 2		
			9 9		
			7 9		
IgG1 de tipo silvestre	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
variant 1	.....	.....	.....	.....	.....
variant 2	.....	.....	..N.....	.....	.....
variant 3	.....	.....	.....	.....	.....
				3 3	
				5 6	
				9 1	
IgG1 de tipo silvestre	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS
variant 1	.....	.....	.....	.....	.....
variant 2	.....	.....	.....	..N.T....	.....
variant 3	.....	.....	.....	.....	.....
					4 4
					1 2
					9 1
IgG1 de tipo silvestre	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC
variant 1	.....	.....	.....	.....	.....
variant 2	.....	.....	.....	.....	.....
variant 3	.....	.....	.....	.....	..N.T....
IgG1 de tipo silvestre	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK		
variant 1	.....	.....	..		
variant 2	.....	.....	..		
variant 3	.....	.....	..		

Figura 7

