

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 918**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2008 PCT/US2008/077847**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2009 WO09045894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08836614 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2205258**

54 Título: **Métodos y conformaciones estructurales de preparaciones de anticuerpos con aumento de la resistencia a las proteasas**

30 Prioridad:

28.09.2007 US 976012 P

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

17.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RAJU, SHANTHA, T. y
SCALLON, BERNARD, J.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 637 918 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).

Métodos y conformaciones estructurales de preparaciones de anticuerpos con aumento de la resistencia a las proteasas

Descripción

Campo de la invención

La invención se refiere a evaluar el contenido glicoforma y conformación estructural de anticuerpos y, más particularmente, a métodos de preparación, utilizando preparaciones de anticuerpos y predicciones conformacionales estructurales para alterar la susceptibilidad a proteasas.

Fondo

Los anticuerpos son glicoproteínas séricas solubles que juegan un papel importante en la inmunidad innata. Las estructuras de carbohidratos de todos los anticuerpos producidos naturalmente en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada varían con el isotipo (Figura 1). Cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de oligosacáridos unidos por N, que afectan de forma variable al ensamblaje de proteínas, secreción o actividad funcional (Wright, A., y Morrison, SL, Trends Biotech., 15: 26-32 (1997)). La estructura de los oligosacáridos N enlazados unidos (Figura 2) varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos biantenarios de alto contenido en manosa, así como complejos con o sin residuos de Fcosa de GlcNAc y núcleo de núcleo (Wright, A., y Morrison, SL, supra). Típicamente, hay un procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacáridos centrales unidas a un sitio de glicosilación particular de manera que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glicoformas múltiples. Del mismo modo, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre las líneas celulares productoras de anticuerpos, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo.

Entre los isotipos de anticuerpos (por ejemplo, IgE, IgD, IgA, IgM, e IgG), las IgG son las más abundantes, exhibiendo las subclases IgG 1 el grado más significativo y variedad de funciones efectoras. Los anticuerpos del tipo IgG1 son los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia del cáncer, donde ADCC y la actividad de los CDC se consideran a menudo importantes. Estructuralmente, la región de bisagra IgG y los dominios CH2 juegan un papel importante en las funciones efectoras del anticuerpo. Los oligosacáridos unidos a N presentes en la región Fc (formados por la dimerización de los dominios bisagra, CH2 y CH3) afectan las funciones efectoras. Estos oligosacáridos unidos covalentemente son estructuras de tipo biantenario complejas y son altamente heterogéneas (ver Fig. 2); NANA, ácido 5 - N - acetilneuramínico, (NeuAc) o NGNA, ácido 5 - N - glicolilneuramínico (NeuGc) es típicamente "ácido siálico". Se han encontrado otros ácidos siálicos o se pueden sintetizar químicamente. Un sitio de glicosilación N-enlazado conservado en Asn297 se encuentra en cada dominio CH2. En el anticuerpo maduro, los dos oligosacáridos bi-antenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando amplios contactos con la cadena principal del polipéptido. Se ha encontrado que su presencia es esencial para que el anticuerpo medie 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).

La presencia biológica y la importancia de sacáridos individuales en posiciones específicas también ha comenzado a explorarse. Por ejemplo, el grado de galactosilación de los anticuerpos está afectado por la edad, el género y la enfermedad (Raju, TS, et al., Glycobiology 2000. 10 (5): 477-86). En general, las estructuras de oligosacáridos son algo específicas a la especie y varían ampliamente. Además, se ha estudiado también la importancia biológica de las estructuras de oligosacáridos con y sin residuos de GlcNAc y núcleo de fucosa en dosificación. La IgG humana y muchas de las IgG producidas de forma recombinante contienen cantidades menores de oligosacáridos sialilados (o no asilados o asialilados), sin embargo, la inmensa mayoría de IgG contienen estructuras de oligosacáridos no sialilados.

La escisión proteolítica de anticuerpos se produce naturalmente en condiciones fisiológicas y también puede ser una etapa de procesamiento industrial en la producción de agentes terapéuticos biológicos basados en la estructura del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos terapéuticos producidos o procesados con papaína, Fabs, están adquiriendo un uso más extendido. Aunque la papaína es una enzima derivada de plantas, hay un número de sitios de escisión de proteasa identificados en la bisagra de IgG1 y se resumen en la Figura 3.

El documento WO 2007/024743 describe preparaciones de anticuerpos resistentes a proteólisis.

Las IgG recombinantes se pueden convertir en fragmentos de IgG, tales como Fab y F(ab')₂ y Fc, usando diversas enzimas proteolíticas (figuras 1 y 3). Los fragmentos de digestión representan una de las principales clases bioterapéuticas útiles en el manejo y tratamiento de enfermedades humanas. El fragmento Fab de 47.615 daltons se purifica a partir de sobrenadante de cultivo celular, digestión con papaína y cromatografía en columna. Otros ejemplos incluyen: DigiFab (DigiTAB), una preparación de fragmentos Fab de anticuerpos policlonales de oveja, para el tratamiento potencial de la intoxicación por digoxina, CroFab, una preparación de fragmentos Fab

monovalentes obtenidos a partir de ovinos inmunizados con venenos de serpiente, como antiveneno contra las picaduras de los cuatro crotales norteamericanos más comunes aprobados en Estados Unidos en octubre de 2000, y EchiTAb, un antiveneno basado en fragmentos Fab de anticuerpos monocelulares policlonales de oveja, para el tratamiento de mordeduras por la víbora de la alfombra (*Echis Ocellatus*), una serpiente prevalente en África Occidental. Otros Fabs en desarrollo incluyen ranibizumab (rhuFab V2, AMD-Fab, Lucentis), una variante de Fab de alta afinidad del bevacizumab de Genentech, como tratamiento potencial para la degeneración macular relacionada con la edad, y 5G1.1, Traumático que evita la división del componente C5 del complemento humano en sus componentes proinflamatorios, como un tratamiento potencial para varias enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo artritis reumatoide (RA), nefritis membranosa y lúpica, dermatomiositis y hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH).

Otras composiciones que contienen Fab con potencial uso terapéutico incluyen Fab modificados químicamente, tales como CDP-870 un fragmento anti-TNF-alfa-Fab humanizado ligado a polietilenglicol (PEG). CDP-870 se deriva de un anticuerpo anti-TNFalpha de ratón que se seleccionó por su alta afinidad de unión y potencial neutralizante. Los fragmentos Fab de este anticuerpo se construyeron mediante tecnología de ADN recombinante, se humanizaron y se sintetizaron mediante fermentación en lotes alimentados en *E. coli*. El rendimiento de este procedimiento de fermentación alcanzó entre 300 y 1200 mg de proteína/1 cultivo bacteriano. Para aumentar la semivida del plasma, se añadió un resto de PEG a los fragmentos Fab. Para ello, se desarrolló un método de conjugación específico de sitio en el que se introdujo un solo residuo de cisteína en la región de bisagra del fragmento Fab para la adición covalente del resto de polímero hidrófilo (PEG) con el fin de aumentar su semivida circulante. El uso de una tecnología *E. coli* de bajo coste para producir los fragmentos Fab, permitió al fabricante (Celltech) reducir los costes de fabricación de CDP-870 en 10 a 20 veces en comparación con anticuerpos que se producen convencionalmente en cultivo de células de mamífero. *E. coli* no expresan proteínas glicosiladas.

Hasta la fecha, la relación entre la presencia y composición de glucano sobre la susceptibilidad de las IgG a la escisión proteolítica de especie humana o de otros no se ha entendido completamente. Por lo tanto, existe la necesidad de comprender la relación entre el patrón proteolítico y la estructura de glicano de estructuras de anticuerpos terapéuticamente relevantes para los propósitos de producción eficiente de anticuerpos y como una herramienta para identificar la presencia y/o composición de anticuerpos glicanos. Tales estudios también ayudan a entender la relación estructura-funcional de las interacciones carbohidratos-proteínas junto con el impacto de las interacciones de los carbohidratos con la proteína en las funciones del anticuerpo.

Resumen de la invención

La invención proporciona una preparación de proteína de Fc de IgG que contiene glicosilada, en la que uno o más residuos de Fc en la región CH2 de la proteína que contiene Fc glicosilada se mutan para mantener o para aumentar las interacciones hidrófobas y disminuir las interacciones hidrófilas en el CH2 o CH3 en las que las mutaciones son Lys 246 Ala, Thr 260 Ala y/o Arg 301 Ala.

Se describen aquí métodos para potenciar la capacidad de las preparaciones de anticuerpos para resistir la escisión por proteasas y métodos de uso de tales preparaciones de anticuerpos para tratar condiciones patológicas asociadas con la presencia de niveles elevados de proteasas, tales como el cáncer.

En una realización del método de la invención, una molécula que contiene Fc mantiene interacciones hidrófobas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la columna de oligosacárido presentes en las regiones CH2 de la Fc y disminuye reacciones hidrófilas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar en las regiones CH2 de la preparación de proteína que contiene Fc. En una realización, las interacciones hidrófilas están entre residuos de galactosa en el brazo alfa-1,6 y el aminoácido reside en el dominio CH2 y/o entre residuos de ácido siálico y residuos de aminoácidos en el dominio CH2.

En otra realización del método, la proteína del Fc contiene glicofomas G0 sin las interacciones hidrofílicas entre los residuos de azúcar de la galactosa y los residuos de aminoácidos en las regiones CH2 y las interacciones hidrófobas mantenidas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la cadena principal de oligosacáridos son las interacciones carbohidrato-carbohidrato y las interacciones carbohidrato-proteína.

En otra realización más del método, la proteína que contiene Fc es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico. La proteasa, cuya actividad de escisión debe ser resistida, se selecciona del grupo que consiste en pepsina, una metaloproteinasa de matriz, tripsina, quimotripsina y una enzima de modificación de glicosilación y en la que la metaloproteinasa de matriz se selecciona del grupo que consiste en metaloproteinasa-7 de matriz (MMP-7), elastasa de neutrófilos (HNE), estromelisina (MMP-3) y elastasa de macrófagos (MMP-12).

En todavía otra realización del método, uno o más residuos de Fc en la región CH2 están mutados para mantener o para aumentar las interacciones hidrófobas y disminuir las interacciones hidrófilas en las regiones CH3 o CH2 en las que las mutaciones son Lys 246 Ala, Thr 260 Ala y/o Arg 301 Ala La enfermedad a tratar se caracteriza por la invasión de neutrófilos en un sitio afectado en el cuerpo, tal como una enfermedad inflamatoria inmunomediada (por ejemplo, artritis reumatoide).

Se describe aquí un método para reducir la capacidad de una preparación de anticuerpos para resistir la escisión por una proteasa y métodos de uso de tales preparaciones de anticuerpos a enfermedades o condiciones asociadas con la presencia de niveles reducidos de las proteasas. La molécula que contiene Fc disminuye las interacciones hidrófobas entre las cadenas laterales de Fc y los residuos de azúcar del esqueleto de oligosacárido presentes en las regiones CH2 del Fc y/o aumenta las reacciones hidrófilas entre las cadenas laterales de Fc y los residuos de azúcar en las regiones CH2 de la preparación de proteína que contiene Fc.

Se describe aquí un método para detectar o diagnosticar un estado de enfermedad en una célula o sujeto, que comprende la determinación del estado de interacciones hidrófobas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la columna vertebral oligosacárido presentes en las regiones CH2 de la Fc y/o reacciones hidrófilas entre cadenas laterales de Fc y residuos de azúcar en las regiones CH2 de la preparación de proteína que contiene Fc en la célula o sujeto.

La presente invención proporciona además cualquier invención descrita en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 representa los dominios de IgG de anticuerpo que muestran la relación entre los dominios y los fragmentos de escisión designados mayormente.

Fig. 2 es una representación esquemática de las variaciones en la estructura de oligosacáridos biantenarios encontrada en la IgG humana.

Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos en la región de bisagra de IgG1 humana y sitios de escisión para diversas enzimas.

Figs. 4A-G son grabaciones MALDI-TOF-MS con información de pico sobre la identificación de especies superpuestas (+1 es ion molecular cargado individualmente, +2 es ion molecular doblemente cargado, +3 es ion trifásico con carga triple y LC es cadena ligera libre) y mostrando la formación de fragmentos de IgG en el tiempo durante la digestión con papaína para una preparación glicosilada y desglicosilada: (A) sin digerir, (B) 1/2 horas, (C) 1 hora, (D) 2 horas, (E) 4 horas, (F) 8 Horas, y (G) después de 24 horas.

Fig. 5 muestra una comparación del porcentaje de área de pico de los iones moleculares +1 de IgG intactas (A) y fragmentos Fc (B) de muestras de IgG glicosiladas y desglicosiladas durante la digestión con papaína.

Fig. 6 muestra trazados del análisis de MALDI-TOF-MS de preparaciones de glicofomas IgG homogéneas intactas descritas en el Ejemplo 5 para glicofomas G0, G2 y G2S2.

Figs. 7A-D muestran trazados del análisis MALDI-TOF-MS de los glicanos liberados de PGNasa a partir de las diversas preparaciones de glicofoma homogénea y de la muestra de control.

Fig. 8 muestra los trazados del análisis de MALDI-TOF-MS de digestiones de papaína de preparaciones G0, G2 y G2S2 de glicofoma IgG homogéneas junto con una muestra de control sometida a digestión de papaína a razón de 50: 1 a 37°C después de 15 minutos con las diversas identidades de pico marcadas.

Fig. 9 es una representación gráfica del área de pico integrada de la IgG intacta a partir del análisis MALDI-TOF-MS de digestos de papaína de preparaciones G0, G2 y G2S2 de glicofoma IgG homogéneas relativas a un control sometido a digestión con papaína a razón de 50: 1 a 37°C en varias ocasiones.

Fig. 10 es una representación gráfica del área de pico integrada del dominio Fc a partir del análisis MALDI-TOF-MS formado durante la digestión con papaína de preparaciones G0, G2 y G2S2 de glicofoma IgG homogéneas junto con una muestra de control en diversos momentos.

Fig. 11 es una representación gráfica del patrón de enlace de hidrógeno entre el sacárido G2 y los residuos de aminoácidos en el Fc.

Fig. 12 es una representación gráfica del patrón de unión de hidrógeno entre el sacárido G0 y los residuos de aminoácidos en la Fc.

Fig. 13 es una representación gráfica de interacción hidrófoba (interacciones de hidratos de carbono en carbohidratos) entre las dos cadenas de oligosacáridos presentes en la región Fc de anticuerpos.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

AA, ácido antranílico; α -1,3GT, α -1,3-galactosiltransferasa; β -1,4GT, β -1,4-galactosiltransferasa; α -2,3ST, α -2,3 sialiltransferasa; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; CDC, citotoxicidad dependiente del complemento; CMP-Sia, ácido N-acetilneuramínico de monofosfato de citidina; FBS, suero bovino fetal; IgG, inmunoglobulina G; MALDI-TOF-MS, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización láser/desorción asistida por matriz; NANA, isómero del ácido N-acetilneuramínico de ácido siálico; NGNA, isómero del ácido N-glicolilneuramínico de ácido siálico; PNGasa F, péptido N-glicosidasa F; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa; SA, ácido sináptico; Sia, ácido siálico; SDHB, ácido dihidroxibenzoico que contiene cloruro sódico; UDP-Gal, galactosa de difosfato de uridina; UDP-GlcNAc, N-acetilglucosamina de difosfato de uridina.

Definiciones

Los términos "Fc", "Fc que contiene la proteína" 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 CH2 de inmunoglobulina y el dominio CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dimérica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

El término "anticuerpo" pretende abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, las partes especificadas y las variantes de los mismos, incluyendo, sin limitación, los miméticos de anticuerpos o que comprende 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 porciones de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, Fab (por ejemplo, por digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (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, mediante técnicas de biología molecular) fragmentos, están abarcados por el término anticuerpo (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, supra).

[0023] 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.

Digestión enzimática de anticuerpos

Debido a su unión diana de alta afinidad, Fab también proporciona un resto diana dirigido, por ejemplo, la conjugación de toxinas o para incrustar estructuras más complejas, tales como liposomas. Como una mejora a vesículas de lípidos circulantes largos que llevan fármaco encapsulado, dirigidos o se espera que inmunoliposomas permitan la administración más precisa de sustancias activas al tejido enfermo o patógenos sin afectar las células normales, reduciendo así los efectos secundarios. El uso de IgG y Fab como restos de direccionamiento para los liposomas terapéuticos descritos en US4957735 y Maruyama et al. (1995) Biochim Biophys Acta 1234: 74-80.

La papaína es una proteasa de sulfhidrilo que se ha utilizado para digerir los anticuerpos IgG en cualquiera de los dos Fab o F(ab')₂, dependiendo de si L-cisteína está presente o ausente durante la reacción, respectivamente. El tratamiento prolongado, o cantidades excesivas de papaína, típicamente resulta en la digestión excesiva del dominio Fc, aunque los dominios Fab a menudo permanecen resistentes a la digestión excesiva con papaína. Esto es porque el dominio Fc contiene sitios de escisión de la papaína (secundarios) adicionales (Fig. 1). El residuo de histidina es la posición C-terminal de abciximab cuando digestión con papaína se lleva a cabo en presencia de cisteína.

IgG1 humana (SEQ ID NO: 1): A-E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G

IgG2 humana (SEQ ID NO: 2): C-P-P-L-K-E-C-P-P-C-P-A-P-P_-V-A-G

IgG3 humana (SEQ ID NO: 3): C-D-T-P-P-P-C-P-R-P-C-P-A-P-E-L-L-G

IgG4 humano (SEQ ID NO: 4) : S-K-Y-G-P-P-C-P-S-C-P-A-P

Mientras que la papaína es una enzima útil industrialmente, es de origen vegetal aislado originalmente de la fruta verde y hojas de *Carica papaya* (*Caricaceae* spp). Una enzima de mamífero industrialmente útil, es pepsina. La pepsina es autoactivada y activa un pH bajo ya que es un componente normal del fluido gástrico secretado en el lumen del estómago después de comer. Los bajos niveles de la enzima precursora pepsinógena 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 leucina₂₃₄-leucina₂₃₅ en la bisagra inferior. Este sitio de escisión está aguas abajo desde el centro de bisagra (-CPPC-) que contiene dos residuos de cisteína que enlazan las dos cadenas pesadas mediante enlaces de disulfuro que crean una molécula F(ab')₂ que es bivalente para la unión del antígeno.

La región de bisagra inferior/CH2, P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V-F (SEQ ID NO: 5) está dentro del dominio en el que existen sitios de escisión para la MMP-3 y MMP-12 (P-A-P*E-L-L-G (SEQ ID NO: 6) para cada uno), así como pepsina y MMP-7 (P-A-P-E-L*L-G para cada uno). Además, un grupo de enzimas fisiológicamente relevantes; elastasa de los neutrófilos (HNE), estromelisin (MMP-3) y la elastasa de macrófagos (MMP-12) escinde IgG en diferentes posiciones para generar sutilmente fragmentos diferentes de F(ab')₂ Fab y Fc (Fig. 3).

Se encontró que un cambio en las interacciones hidrófobas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la columna de oligosacárido presente en las regiones CH2 de la Fc y/o un cambio en las reacciones hidrófilas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar en regiones CH2 de la preparación de proteína que contiene Fc altera la susceptibilidad a la degradación enzimática de dichos anticuerpos, lo que resulta en la modulación de

diversos aspectos de los procesos de producción y las acciones biológicas de dichos anticuerpos. Más específicamente, la Fc de Abs con el aumento de las interacciones hidrófobas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de columna de oligosacárido presente en las regiones CH2 de la Fc y/o disminución de reacciones hidrófilas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar en las regiones CH2 de la Fc que contiene preparación de proteína son más resistentes a la digestión con papaína de Fc que contiene proteínas sin tal aumento y/o disminución. Además, el Fc de Abs con disminución de interacciones hidrófobas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la cadena principal de oligosacáridos presentes en las regiones CH2 de la Fc y/o reacciones hidrófilas incrementadas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar en las regiones CH2 de la Fc que contiene preparación de proteína son menos resistentes a la digestión con papaína de Fc que contiene proteínas sin dicha disminución y/o aumento.

La presente invención comprende además un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc alterando las interacciones hidrófobas y/o hidrófilas descritas anteriormente.

La presencia o ausencia de glicanos en la molécula que contiene Fc afecta a la afinidad por uno o más de los receptores Fc y RI, Fc y RIIA y Fc y RIIIA, la actividad ADCC, macrófagos o activación de monocitos, y la semivida en suero (Lifely et al., Jeffreis, y Wright y Morrison, *supra*). Por lo tanto, ya que la degradación proteolítica es una medida de la glicosilación y la glicosilación es un requisito para las funciones secundarias de un anticuerpo de clase IgG, la susceptibilidad a la proteólisis se convierte en un marcador para las funciones anteriormente mencionadas de dicho anticuerpo de clase IgG. Por ejemplo, el ácido siálico tiene una carga neta negativa a pH fisiológico y, por lo tanto, podría esperarse la presencia de ácido siálico en el hidrato de carbono Fc unida para alterar la estructura tridimensional y por lo tanto la conformación del dominio CH2 y de ese modo afectar la accesibilidad Fc por enzimas proteolíticas. En consecuencia, el contenido de ácido siálico del oligosacárido unido al dominio CH2 es un determinante de la susceptibilidad proteolítica y la tasa de escisión proteolítica es una medida del contenido de ácido siálico de la IgG u otra proteína que contiene Fc.

Enriquecimiento de las glicofomas de Fc que contienen proteínas

Un enfoque para la preparación de sublotos de una proteína particular que contiene Fc, que difieren en contenido y estructura de glicano consiste en tomar una preparación de proteína que contiene Fc con oligosacáridos heterogéneos Fc, incluyendo moléculas tanto glicosiladas como aglicosiladas, y pasarla a través de una columna que contiene una lectina inmovilizada que tiene afinidad diferencial para, por ejemplo, oligosacáridos sialilados y asialilados. El flujo no vinculante (T, por) o la fracción de columna no unida se pueden separar de la fracción unida (B, vinculada), recogida mientras que pasa el tampón de elución a través de la columna. También puede ser posible recoger por separado una fracción débilmente unida o de la columna de fracción retardada (R, retrasada), por ejemplo, mediante la recopilación de Fc que contiene proteína que eluye durante continuo lavado de la columna con el tampón de muestra original. Dependiendo de la lectina utilizada, se espera que la fracción de unión tenga un sacárido superior, por ejemplo, ácido siálico, el contenido, por tanto, contenido oligosacárido, que la fracción no vinculante.

Los ejemplos de lectinas que pueden enriquecerse para proteínas que contienen Fc sialilada o asialilada son la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que se une específicamente oligosacáridos con ácido siálico terminal, y la aglutinina de germen de trigo de lectina (WGA), que se une específicamente oligosacáridos ya sea con ácido siálico terminal o N-acetilglucosamina terminal (GlcNAc). Otro ejemplo es la lectina Ricina I (RCA), que se 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 Vector Labs y EY Labs.

Modificación enzimática de proteínas que contienen Fc

Un enfoque alternativo para la preparación de sublotos de una proteína que contiene Fc que difieren en el contenido de glucano consiste en tratar una parte de una preparación de proteína que contiene Fc con una sacarasa, tal como una fucosidasa o enzima de sialidasa, eliminando de este modo los residuos específicos de azúcar, por ejemplo, fucosa o ácidos siálicos. El material resultante afucosilada o asialilada puede ser comparado con el material original, parcialmente fucosilado o sialilado de las diferencias en la actividad biológica.

La adición de sacáridos a la región Fc también se puede lograr utilizando métodos de glicosilación *in vitro*. Glicosiltransferasas naturales funcionan para sintetizar oligosacáridos. Producen productos específicos con excelente geometría estereoquímica y regioquímica. La transferencia de los resultados de residuos de glicosilo en el alargamiento o la síntesis de un oligo o polisacárido. Un número de tipos de glicosiltransferasa se han descrito, incluyendo sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas, manosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas y similares.

Las glicosiltransferasas que son útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, α -sialiltransferasas, α -glucosiltransferasas, α -galactosiltransferasas, α -fucosil-transferasas, α -manosiltransferasas, α -xilosiltransferasas, α -N-acetilhexosaminiltransferasas, β -sialiltransferasas, β -glucosiltransferasas, β -galactosiltransferasas, β -fucosiltransferasas, β -manosiltransferasas, β -xilosiltransferasas, y β -N-acetilhexosaminiltransferasas, tales como de

Neisseria meningitidis, u otras fuentes bacterianas, y de rata, ratón, conejo, vaca, cerdo, fuentes virales humanas y de insectos. Preferiblemente, la glicosiltransferasa es una variante de truncamiento de la enzima de glicosiltransferasa en la que se ha suprimido el dominio de unión a membrana.

5 Galactosiltransferasas ejemplares incluyen $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa (E.C. 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 (E.C. N° 2.4.1.38). Otras glicosiltransferasas se pueden utilizar, tal como una sialiltransferasa.

10 Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa, a menudo denominada 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 ácido CMP-siálico a un residuo de Gal con la formación de un enlace α 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 como α , (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al terminal no reductor de Gal de un Gal β 1 \rightarrow 3Glc disacárido o glicósido. 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). Otro ejemplo de α -2,3- sialiltransferasa (E.C. 2.4.99.4) transfiere ácido siálico al terminal no reductor de Gal del disacárido o glucósido. Véase, Rearick et al., J. Bio I. Chem., 254: 4444 (1979) y Gillespie et al, J. Biol. Chem., 267: 21004 (1992). Enzimas ejemplares adicionales incluyen Gal- β -1,4- GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (Véase, Kurosawa et al. Eur J. Biochem 219: 375-381 (1994)).

20 Otras glucosiltransferasas particularmente útiles en la preparación de 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.

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

35 Para aquellas realizaciones en las que el método ha de practicarse a escala comercial, puede ser ventajoso inmovilizar la glicosiltransferasa en un soporte. Esta inmovilización facilita la eliminación de la enzima del lote de producto y la posterior reutilización de la enzima. Inmovilización de glicosiltransferasas se puede lograr, por ejemplo, mediante la eliminación de la transferasa de su dominio de unión a membrana, y adjuntando en su lugar un dominio de unión a celulosa. Un experto en la técnica entenderá que otros métodos de inmovilización también podrían utilizarse y se describen en la literatura disponible.

40 Debido a que los sustratos aceptores pueden ser esencialmente cualquier monosacárido u oligosacárido que tiene un residuo de sacárido terminal para el que la glicosiltransferasa particular exhibe especificidad, el sustrato puede sustituirse en la posición de su extremo no reductor. Por lo tanto, el aceptador glicósido puede ser un monosacárido, un oligosacárido, un sacárido marcado con fluorescente, o un derivado de sacárido, tal como un antibiótico aminoglicósido, un gangliósido, o una glicoproteína incluyendo anticuerpos y otras proteínas que contienen Fc. En un grupo de realizaciones preferidas, el aceptor de glicósido es un oligosacárido, preferiblemente, Gal β (1-3)GlcNAc, Gal β (1-4)GlcNAc, Gal β (1-3)GalNAc, Gal β (1-4)GalNAc, Man α (1,3) Man, Man α (1,6)Man, o GalNAc β (1-4)-manosa. En una realización preferida particular, el aceptor de oligosacárido está unido al dominio de CH2 de una proteína que contiene Fc.

50 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 glicosiltransferasa (también conocida como un sistema de reciclaje). Por ejemplo, como se enseña en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. 6.030.815, un sistema de reciclado de ácido siálico CMP utiliza sintetasa de ácido siálico CMP para reponer ácido siálico CMP (CMP-NeuAc) ya que reacciona con un aceptor de sialiltransferasa en presencia de una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa para formar sialilo- sacárido. El sistema de regeneración de ácido siálico CMP 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 una quinasa de monofosfato de nucleósido (por ejemplo, mioquinasa) capaz de transferir el fosfato terminal desde un nucleósido trifosfato a CMP. La $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa y sintetasa de ácido siálico de CMP también se pueden ver como parte del sistema de regeneración de ácido siálico de CMP ya que la eliminación del ácido siálico activado sirve para mantener la velocidad de avance de la síntesis. La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación utilizando un fagémido que comprende un gen para una enzima de sintetasa modificada con ácido siálico CMP se da a conocer en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada en octubre de 1, 1992.

65 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 enseña en la patente de los Estados Unidos. 5.952.203. Los derivados de glicosilo activado actúan como suplentes de sustratos naturales, que son nucleótidos de azúcar caros, generalmente difosfoazúcares de nucleótidos o monofosfoazúcares de nucleótidos en que el fosfato de nucleótidos está α -vinculado a la posición 1 del azúcar.

Derivados de glicósido activado que son útiles incluyen un grupo saliente activado, tal como, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo, éster 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, siendo fluoruros de glicosilo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo, α -galactosilo fluoruro, α -manosilo fluoruro, α -glucosilo fluoruro, α -fucosilo fluoruro, α -xilosilo fluoruro, α -sialilo fluoruro, α -N-acetilglucosaminilo fluoruro, α -N-acetilgalactosaminilo fluoruro, β -galactosilo fluoruro, β -manosilo fluoruro, β -glucosilo fluoruro, β -fucosilo fluoruro, β -xilosilo fluoruro, β -sialilo fluoruro, β -N-acetilglucosaminiltransferasa fluoruro y β -N-acetilgalactosaminilo fluoruro son los más preferidos.

Fluoruros de glicosilo se pueden preparar a partir del azúcar libre acetilando primero el azúcar y luego tratándolo 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 bencilado del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos de bencilo.

Un componente adicional de la reacción es una cantidad catalítica de un fosfato de nucleósido o análogo. Monofosfatos de nucleósido 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. [0046] Un procedimiento para la modificación de proteínas recombinantes producidas, en, por ejemplo, células murinas en donde la forma hidroxilada de ácido siálico predomina (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, ser tratada con el reactivo de CMP-NANA y alfa-2,3 sialiltransferasa para dar glicofomas G2S2 altamente homogéneas.

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

Caracterización estructural de variantes de ácido siálico

Para la caracterización estructural de las variantes de ácido siálico que contienen oligosacáridos, las preparaciones de glicoproteína incluyendo preparaciones de anticuerpos fueron tratadas con péptido-N-glicosidasa F para liberar los oligosacáridos N-ligados. La enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) escinde oligosacáridos ligados a asparaginas. Los oligosacáridos liberados están etiquetados con fluorescencia con ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico), se purificaron y analizaron por HPLC según lo estipulado (véase Anumula, K.R. y Dhume ST Glycobiology 1998 Jul; 8 (7): 685-94). Alternativamente, los oligosacáridos liberados pueden ser sometidos a MALDI-TOF-MS, como se describe en el presente documento o para ESI-MS. Los oligosacáridos separados como diversos pesos moleculares discretos, tales como G0, G1, G2, G2S1 y G2S2, por estos métodos pueden ser detectados y cuantificados.

Caracterización biológica de variantes de glicofoma

Proteínas que contienen Fc pueden ser comparadas para la funcionalidad por varios ensayos in vitro bien conocidos. En particular, la afinidad para los miembros de la familia Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII de receptores Fc γ es de interés. Estas mediciones se podrían hacer mediante el 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 prolongada vida media en circulación de las 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 de variante particulares. En una realización, el ensayo de ADCC está configurado para que células NK sean la célula efectora primaria, reflejando así los efectos funcionales sobre el receptor FcγRIIIA. Ensayos de fagocitosis también se pueden usar para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes variantes, al igual que ensayos que miden las respuestas celulares, tales como superóxido o liberación de mediadores inflamatorios. Modelos in vivo se pueden utilizar también, como, 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 Fc de acoplamiento que vinculan ligandos específicos, tales como receptores de Fcγ.

10 **Procesos de producción de proteínas**

Diferentes procesos involucrados con la producción de proteínas que contienen Fc pueden impactar la 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 activas de sialidasa 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 puede contener enzimas de sialidasa, de tal manera que la proteína que contiene Fc tiene niveles más altos o más bajos de glicosilación o las variantes de glicosilación.

En otra realización, las condiciones usadas para purificar y procesar adicionalmente proteínas que contienen Fc se establecen que favorecerán el contenido de glucano óptimo. En una realización, las condiciones producen contenido de oligosacárido máximo o mínimo o provocan la transformación del polipéptido que contiene Fc expresado en una glicofoma predominante. Por ejemplo, ya que el ácido siálico es de ácido lábil, la exposición prolongada a un entorno de pH bajo, tal como después de la elución de columna de cromatografía de proteína A o esfuerzos de inactivación viral, pueden conducir a una reducción en el contenido de ácido siálico.

30 **Selección de células huésped o ingeniería de célula huésped**

Como se describe en el presente documento, la célula huésped elegida para la expresión de la proteína que contiene Fc recombinante o anticuerpo monoclonal es un contribuyente importante a la composición final, 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.

En una realización en la que se controla el contenido de ácido siálico, la célula huésped es una célula que es naturalmente deficiente o carente de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped se modifica genéticamente para ser 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 es naturalmente desprovista de, o se modifica genéticamente para ser desprovista de la sintetasa de ácido siálico de CMP, 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 ser naturalmente desprovista de, o está modificada genéticamente para ser desprovista de la sintetasa de ácido pirúvico, la enzima que forma ácido siálico a partir de ácido pirúvico.

En una realización adicional, la célula huésped puede ser naturalmente desprovista de, o está modificada genéticamente para ser 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 secretan o se secretan en el medio de cultivo y actúan sobre los anticuerpos que ya han sido secretados en el medio y pueden contener además una galactasa. Métodos de selección de líneas celulares con glicosilas alteradas y que expresan glicoproteínas con composiciones de carbohidratos alterados han sido descritos (Ripka y Stanley, 1986. Somatic Cell Mol Gen 12: 51-62; US2004/0132140). Métodos de ingeniería de células huésped para producir anticuerpos con patrones de glicosilación alterados resultantes en una mayor ADCC se han enseñado en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6.602.864, en la que las células huésped albergan un ácido nucleico que codifica al menos una glicoproteína de la modificación de transferasa de glicosilo, específicamente β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII).

Otros enfoques para la ingeniería genética de las propiedades de glicosilación de una célula huésped mediante la manipulación de la glicosiltransferasa de célula huésped implican la eliminación o supresión de la actividad, como se enseña en EP1,176,195, específicamente, α1,6 fucosiltransferasa (producto del gen FUT8). Sería conocido para un experto en la técnica 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 ser seleccionado de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insecto o vegetales, o cualquier derivado, células inmortalizadas o transformadas.

5 En otra realización, el método de suprimir o eliminar la actividad de la enzima necesaria para unión de oligosacárido puede seleccionarse del grupo que consiste de silenciamiento de genes, tal como mediante el uso de ARNsi, genéticos knock-out, o adición de un inhibidor de enzima, tal como por co-expresión de un Ab intracelular o péptido específico para la enzima que se une y bloquea su actividad enzimática, y otras técnicas de ingeniería genética conocidas. En otra realización, un método para mejorar la expresión o la actividad de una enzima que
10 bloquea la unión de sacárido, o una enzima de 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 de la enzima de ARN, todo lo cual conlleva 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
15 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 u organismo, tal como, por ejemplo, *E. coli spp*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp* natural o diseñado.

20 Anticuerpos

Un anticuerpo descrito en esta solicitud puede incluir o ser derivado de cualquier mamífero, tal como, pero no limitado a, un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos e incluye anticuerpos aislados humanizados y/o injertados con CDR, humanos, de primate, de roedores, de mamíferos, quiméricos, variantes de inmunoglobulinas, productos de escisión y otras partes especificadas. La
25 invención también se refiere a la codificación de anticuerpo o ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos, plantas transgénicas, y métodos de fabricación y uso de los mismos, como se describe en el presente documento conjuntamente en combinación con lo que se conoce en el arte.

30 Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc descritas 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 con los péptidos diana. Así, los anticuerpos 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 et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Harlow y Lane, antibodies, a
35 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).

40 Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc o componentes y dominios de los mismos también pueden ser obtenidos 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 o humano inmunizado (Smith, GP 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
45 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 ser manipulada para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca de producir y luego identificar anticuerpos humanos monoclonales adicionales deseables. Por ejemplo, los genes que codifican moléculas de cadena pesada (H) y cadena ligera (L) de inmunoglobulina pueden ser mezclados al azar (barajados) 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 ser mutagenizadas en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente examinados para capacidades de afinidad y neutralización deseables. Bibliotecas de anticuerpos también pueden ser creadas sintéticamente mediante la
50 selección de una o más secuencias de marco humano 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 de regiones variables de anticuerpos, tales como péptidos.

60 Otras bibliotecas de componentes de unión diana que pueden incluir otras que las regiones variables de anticuerpos son muestras de ribosoma, muestras de levadura, y muestras bacterianas. Muestras de ribosoma son un método de la conmutación 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, L.C. et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 9022). Muestras de levadura se basan en la construcción de proteínas de fusión del receptor asociado a receptor de adhesión de levadura alfa-aglutinina asociado a membrana, aga1 y aga2, una parte del
65

sistema de tipo de apareamiento (Broder, et al. 1997. *Nature Biotechnology*, 15: 553-7). Muestras bacterianas se basan 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).

5 En comparación con la tecnología del hibridoma, fago y otros métodos de muestras de anticuerpos permiten 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.

10 También se describe un método para producir un anticuerpo o proteína de fusión con Fc, que comprende conmutar el ácido nucleico que se codifica bajo condiciones in vitro, in vivo o in situ, de tal manera que el péptido o el anticuerpo se expresa en cantidades detectables o recuperables.

Efecto de glicanos de Fc en la estructura del anticuerpo

15 Los fragmentos Fc de IgG humana de glicofomas G2 y G0 han sido co-cristalizados en la formación de complejos con el péptido MiniZ, una versión 2-hélice diseñada (Z34C) del dominio B de la proteína A, y sus estructuras cristalinas de rayos X se resolvieron en 1,65 y 2,3Å, respectivamente. El péptido MiniZ se utilizó para ayudar en el aumento de la resolución de la estructura cristalina de Fc, y que ayudaría en la creación de estructuras cristalinas de alta resolución de las glicofomas homogéneas de Fc (Kelley et al, 1992; Braisted et al, 1996; Starovasnik et al, 1997; Deisenhofer, 1981; Sauer et al, 1995).

20 Ambas estructuras cristalinas muestran que el fragmento Fc de IgG₁ es un dímero unido a disulfuro de dos cadenas pesadas idénticas que consisten en dominios de CH₂ y CH₃. Cada porción de cadena pesada está relacionada por un eje de dos veces casi perfecto. El complejo G2 y G0 con MiniZ (G2-MiniZ) se cristalizó como un único fragmento Fc unido a una molécula MiniZ en la unidad asimétrica. La diferencia entre los dominios CH₂ y CH₃ resulta de los factores de alta temperatura asociados con dos bucles situados cerca de la parte inferior del dominio CH₂, uno de los cuales está unido al resto de oligosacárido. El dominio de CH₃ tiene un factor de temperatura global menor debido a su contacto de embalaje con una cadena relacionada con simetría, pero contiene dos regiones de bucle que están expuestas al disolvente y que tienen factores de alta temperatura.

30

Estructura de oligosacáridos G2

35 El complejo G2-MiniZ contiene dos oligosacáridos biantenarios complejos idénticos consistiendo cada uno de 4 GlcNAc, 3 Man, 2 Gal, y 1 Fuc. Los residuos de azúcar, de GlcNAc vinculado a Asn297 hasta el núcleo de manosa y a lo largo de la rama α 1 \rightarrow 6- hasta el residuo Gal tienen factores de baja temperatura. Los residuos de GlcNAc y Gal en la rama α 1 \rightarrow 3 no están tan bien resueltos como con Gal en la rama α 1 \rightarrow 6. Los residuos de Gal y GlcNAc en la rama α 1 \rightarrow 3 posiblemente tienen múltiples conformaciones. El Fuc unido a la GlcNAc que a su vez se vinculó a Asn297 también tiene factores de alta temperatura y también puede adoptar múltiples conformaciones. Se observó un total de seis enlaces de hidrógeno (enlaces de H) entre los residuos de azúcar y residuos de aminoácidos en el complejo G2-MiniZ (Fig. 11). El residuo núcleo de GlcNAc enlazado a Asn297 forma un enlace de H con el Arg 301. El segundo GlcNAc en la región del núcleo se enlaza de H con Lys246. El residuo Gal presente en la rama α 1 \rightarrow 6 se enlaza de H con Lys 246 y Thr260 y el residuo GlcNAc que lleva residuo Gal en la rama α 1 \rightarrow 6 se enlaza de H con Asp 265. Los azúcares de ambos monómeros Fc tienen muy poco contacto entre sí excepto que hay una interacción de tipo carbohidrato-carbohidrato entre los dos residuos de Man (Fig. 11) en la rama α 1 \rightarrow 3 de dos oligosacáridos y están en la superficie enterrada.

45

Comparación de la estructura de carbohidratos de glicofomas G2 y G0

50 Cuando los dominios de CH₂ o CH₃ se superponen, la orientación relativa del núcleo y residuos de azúcar de rama α 1 \rightarrow 6- permanece constante para los complejos G2 y G0 que sugieren muy poca libertad de movimiento. En las estructuras cristalinas, la rama de α 1 \rightarrow 3 se mueve por tanto hasta 0,83Å al comparar el residuo GlcNAc en los complejos G2 y G0. La manosa de la cadena A en la rama α 1 \rightarrow 3 tiene poco contacto hidrófobo con la manosa α 1 \rightarrow 3 de la cadena B (Figs. 11 y 12). En la glicofoma G2, Gal 02 se enlaza de H a Thr 260 OG1 y también es 2,8Å desde el oxígeno del carbonilo de Pro244. En la glicofoma G0, Lys 246 ya no se enlaza de hidrógeno a GlcNAc (Fig. 12). Dado que el Gal se ha ido en la rama α 1 \rightarrow 6, el tramo desde Pro244 a Pro 247 sería desestabilizaría ligeramente en complejo GO-MiniZ. El agua ahora ocupa el espacio cerca de donde el Gal O-2 residía y ahora tiene un puente sobre el oxígeno del carbonilo de Pro244 a Thr 260, que proporciona parte de la energía de estabilización. En ausencia de residuos de Gal y GlcNAc, el complejo G-2-MiniZ también tiene propiedades estructurales similares al complejo GO-MiniZ.

60

65 En las estructuras de rayos X, a medida que la estructura de carbohidrato se trunca, la estructura terciaria de Fc parece estar afectada como lo demuestra la pérdida de resolución en la estructura de rayos X y el aumento uniforme en factores B (Krapp et al, 2003). El estudio de RMN usando etiquetado ¹³C selectivo de los glicanos en una IgG2b murina apoya los hallazgos de los datos de rayos X (Gilhespy et al, 1994; Yamaguchi et al, 1998). En este estudio de RMN, los investigadores concluyeron que la movilidad de la cadena de hidrato de carbono es comparable a la de la cadena de esqueleto del polipéptido con la excepción del residuo de galactosa en el extremo

no reductor de la rama α 1 \rightarrow 3 que es extremadamente móvil y que la agalactosilación no induce ningún cambio significativo en la movilidad (Yamaguchi et al, 1998).

5 La importancia de la glicosilación IgG en el Fc ha sido estudiada durante varias décadas y la literatura contiene mucha información sobre el impacto de los glicanos Fc sobre la actividad biológica de las IgG. Además de estos aspectos, en la presente memoria se discute un nuevo aspecto del impacto de glicanos Fc sobre la resistencia a anticuerpo a las proteasas. Ahora está claro que los glicanos de Fc de anticuerpos aumentan la resistencia a las proteasas (Raju y Scallon, 2006). Análisis estructurales de FC por rayos X y estudios de RMN muestran una interacción hidrófoba entre los dos residuos de núcleo Man de la rama α 1 \rightarrow 3 de dos oligosacáridos complejos (véase Fig. 13) (Laskowski et al, 1996; Wormald et al, 1997; Yamaguchi et al, 1998; Krapp et al, 2003). Esta interacción hidrófoba parece ser necesaria para mantener la adecuada conformación Fc para proporcionar aumento de resistencia a las proteasas. La glicosilación Fc también es necesaria para que las IgG exhiban actividades ADCC y CDC que subraya la importancia de la interacción hidrófoba entre los dos residuos de Man. Sin esta interacción hidrófoba, la molécula de anticuerpo puede sobresalir un poco, lo que a su vez aumenta el volumen hidrodinámico alterando así la confirmación en el dominio CH₂. Esta perturbación estructural puede ser responsable de la mayor sensibilidad de la proteasa, y la pérdida de las actividades ADCC y CDC de anticuerpos aglicosilados (o desglicosilados). Junto con los rayos X y el análisis estructural de RMN, los estudios de microcalorimetría de exploración diferencial de IgG2b glicosilada y aglicosilada de ratón-Fc reveló diferencias significativas en la estabilidad de los dominios CH₂ y CH₃ entre las formas glicosiladas y aglicosiladas (Tishchenko, 1998). La energía libre de estabilización del dominio aglicosilado CH₂ disminuyó, lo que sugiere que sea menos estructurado, de acuerdo con la susceptibilidad incrementada observada a las proteasas (Tishchenko, 1998; Simonson y Brunger, 1992).

25 Curiosamente, conclusiones similares pueden extraerse de los estudios comparativos de glicofomas galactosiladas (G2) y agalactosiladas (G0) de fragmentos de IgG1-Fc humana, con una entalpía inferior para la glicofoma G0, en relación con la glicofoma G2, siendo evidente, posiblemente reflejando la pérdida de interacciones entre los oligosacáridos y dominios CH₂ (Ghirlando et al, 1999; Tao y Morrison, 1989). Estos datos se han interpretado como el apoyo a la propuesta de que en la ausencia de un residuo de galactosa de rama α 1 \rightarrow 6 de la cadena de oligosacárido es más móvil (Corper et al, 1997; Ghirlando et al, 1999). La contribución de Phe 241 y Phe 243, Asp 265 y Arg 301 puede proporcionar la mayor parte de la estabilización para interacción de oligosacáridos CH₂ y la energía de estabilización restante proviene de las interacciones de Gal (en rama α 1 \rightarrow 6) con residuos de Lys 246 y Thr 260 (véanse las Fig. 11-13). Estas interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre los residuos de galactosa y de aminoácidos pueden jugar un papel en el aumento de la afinidad de unión de anticuerpos galactosilados a la proteína C1q. Sin embargo, tales interacciones también pueden aumentar la accesibilidad de los residuos de aminoácidos a las proteasas, disminuyendo así la resistencia de anticuerpos galactosilados a las proteasas.

40 Aunque ninguna solución ni datos de cristal están disponibles para anticuerpos sialilados, se cree que las interacciones moleculares entre residuos de ácido siálico y residuos de aminoácidos son las razones para la disminución de la resistencia de anticuerpos sialilados a las proteasas. El ácido siálico está cargado negativamente y más voluminoso que la mayoría de los monosacáridos que se encuentran en las glicoproteínas de origen animal. La carga y voluminosidad también podrían afectar la conformación Fc y por lo tanto afectar la estabilidad del anticuerpo y actividad biológica. Variaciones estructurales menores en glicanos Fc no sólo afectan a las funciones de anticuerpos, sino también afectan a la resistencia de anticuerpo a las proteasas y por lo tanto afectan a la estabilidad del anticuerpo.

Tras haber descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos.

50 **Ejemplo 1: Aislamiento de dominio Fc de IgG**

La papaína se obtuvo de Sigma y PNGasa F (péptido N-glicosidasa F) se obtuvo de New England Biolabs. Ácido sináptico se obtuvo de Fluka. Los análisis MALDI-TOF-MS se llevaron a cabo utilizando la estación de trabajo Voyager DE Biospectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA).

55 Las muestras de anticuerpo se desglicosilaron por tratamiento con PNGasa F en tampón Tris-HCl de 20 mM, pH 7,0. Las muestras de anticuerpo desglicosiladas se purificaron en una columna de proteína A (cartuchos de proteína A HiTrap se obtuvieron de Amersham Biosciences) y se analizaron por MALDI-TOF-MS para la pureza.

60 Las muestras de anticuerpo (en ~ 1 mg/ml, antes y después de la desglicosilación) fueron tratadas con papaína (1:50, en peso) en tampón Tris-HCl de 20 mM, pH 7,0, que contenía 2 mM de L-cisteína y alícuotas se retiraron a intervalos de tiempo fijos (0, 15, 30, 60, 90 minutos, seguido de a 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 24 horas). Las partes alícuotas (aproximadamente 2 μ l) se mezclaron inmediatamente con 2 μ l de solución de matriz (la solución matriz se preparó disolviendo 10 mg de ácido sináptico en 1,0 ml de 50% de acetonitrilo en agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético) y 2 μ l de esta solución se cargó en la placa diana MALDI y se dejó secar al aire antes del análisis.

Datos MALDI-TOF-MS indica que la desglicosilación de IgG en condiciones nativas con PNGasa F es completo y que no destructivo (ver Figs. 4A-G).

5 El análisis MALDI-TOF-MS de alícuotas retiradas en intervalos de tiempo fijos sugieren que la mayoría de la desglicosilada IgG fue digerido por papaína dentro de una hora mientras que la digestión completa de IgG control (glicosilada) realiza más de 4 horas. Los fragmentos Fc (a 10 KDa y 23,7 KDa) de IgG desglicosilada se observan en la digestión de 30 minutos con papaína y la mayor parte del Fc desglicosilada se digirió en fragmentos dentro de las 4 horas. Fragmentos Fc de IgG glicosilada se observan después de sólo 4 horas de digestión con papaína a 1:50 (en peso) de enzima a relación de sustrato y requiere más de 24 horas para convertir completamente Fc glicosilada en fragmentos más pequeños a 10 KDa y 23,7 KDa.

15 Durante los intentos de aislar fragmentos Fc de diferentes anticuerpos IgG, se observó que la eliminación previa de los glicanos del dominio CH2 aumentó la velocidad de degradación de papaína mediada por el dominio Fc, lo que hace más difícil la obtención de Fc intacta de IgG desglicosiladas (o aglicosiladas). Experimentos de evolución de tiempo posteriores que comparan versiones glicosiladas y desglicosiladas de ambos anticuerpos de IgG y dominios de Fc purificados mostraron que, en ambos casos, la velocidad de degradación de Fc en las moléculas desglicosiladas era de al menos 4-8 veces más rápido en comparación con sus homólogos glicosilados. Estos resultados indican que la presencia de glicanos de dominio CH2 aumenta la resistencia a la degradación mediada por la papaína de los dominios Fc. También sugiere que, dado que IgG que carecen de glicosilación parecen no tener una estructura definida de Fc y no se unen a receptores Fc, la sensibilidad de papaína puede constituir un medio adicional para evaluar la estructura adecuada de Fc.

Ejemplo 2: La digestión de papaína de glicofomas homogéneas

25 Para evaluar los parámetros de la digestión con papaína de las preparaciones de anticuerpos sustancialmente homogéneos con respecto a sus patrones de glicosilación, muestras de anticuerpo se modifican enzimáticamente para producir tal preparación para las pruebas tal como se describe a continuación.

30 Para galactosilar muestras de anticuerpo purificadas mediante el método enzimático, se añadieron β -1,4-galactosiltransferasa bovina (β -1,4GT) y UDP-Gal obtenida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a las muestras de anticuerpo. α -2,3-Sialiltransferasa de hígado de rata recombinante (α -2,3ST), α -1,3-galactosiltransferasa recombinante (α 1,3GT) y CMP-Sia se obtuvieron de Calbiochem (San Diego, CA). PNGasa F se obtuvo de New England Biolabs (Beverly, MA) o desde Prozyme (San Leandro, CA) o de Selectin BioSciences (Pleasant Hill, CA). β -Galactosidasa y β -glucosaminidasa de *Diplococcus pneumoniae* se obtuvieron a partir desde ProZyme o desde Selectin BioSciences. β -Galactosidasa de riñón bovino y todas las otras enzimas eran de ProZyme o de Selectin BioSciences. Columnas de proteína A NAP-5 y HiTrap eran de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

40 Los anticuerpos de prueba para estos análisis incluyen IgG Abs monoclonales con IgG1 humana y regiones constantes kappa expresadas en células de mieloma de ratón Sp2/0 transfectadas. Los Mabs son completamente humanos o un MAb quimérico de ratón/humano específico para, por ejemplo, TNF humano.

45 Estructuras biantenarias totalmente galactosilatadas pero no sialiladas se designan glicofomas G2. Anticuerpos G2 se prepararon sometiendo muestras de IgG en tampón MES 100 mM (pH 7,0) (~10 mg en 1,0 ml de tampón) a 50 miliunidades de β 1,4GT, 5 μ mol de UDP-Gal, y 5 μ mol de MnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de enzima y UDP-Gal y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37°C. Las muestras de IgG regalactosilatadas se purificaron usando una columna A de proteína A HiTrap. Los oligosacáridos fueron liberados por PNGasa F y se caracterizaron mediante MALDI-TOF-MS y mediante HPLC como se describen a continuación. Se encontró que las preparaciones resultantes de Mabs contenían 0% de ácido siálico.

50 Completamente sialiladas y anticuerpos galactosilados son designados G2S2. La glicofoma G2S2 fue hecho por traer muestras de IgG en tampón MES 100 mM, pH 7,0, (o 10 mg en 1,0 ml de tampón) usando NAP-5 columnas según el fabricante' protocolo sugerido s. A esta solución se añadieron 50 miliunidades cada uno de β -1,4GT y α 2,3ST y 5 μ mol cada uno de UDP-Gal, CMP-Sia (isómero NANA), y MnCl₂. La mezcla se incubó a 37°C. Después de 24 horas, se añadió otra alícuota de enzimas junto con los azúcares de nucleótidos y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37°C. La glicofoma G2S2 de muestras de IgG se purificó como se describe anteriormente. Usando este método, la sialación de una preparación de anticuerpos alcanzó 90 a 98% de glicofoma G2S2.

60 Abs de prueba se analizaron estructuralmente por diferentes métodos. Para realizar el análisis de MALDI-TOF-MS de IgG Abs intactas, las muestras de IgG se pusieron en tampón de Tris-HCl de 10 mM, pH 7,0 y ajustaron a concentración de ~ 1 mg/ml de tampón. Aproximadamente 2 μ l de solución de IgG se mezcló con 2 μ l de solución de matriz (la solución matriz se preparó disolviendo 10 mg de ácido sinapínico en 1,0 ml de 50% de acetonitrilo en agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético) y 2 ml de esta solución se cargó en la diana y se dejó secar al aire. MALDI-TOF-MS fue adquirido usando un instrumento Voyager DE a partir de Applied Biosystems (Foster City, CA).

Para realizar el análisis de MALDI-TOF-MS de los glicanos Fc liberados, muestras de IgG (~ 50 µg), antes y después de reacciones de glicosilación *in vitro*, se digirieron con PNGasa F en tampón Tris-HCl de 10 mM (50 µl) pH 7,0 durante 4 horas a 37°C. La digestión se detuvo mediante la acidificación de la mezcla de reacción con 50% de ácido acético (~ 5 µl) y luego pasar a través de una columna de resina de intercambio catiónico como se describe previamente (Papac et al, 1996;. Papac et al, 1998;. Raju et al., 2000). Estas muestras que contienen una mezcla de oligosacáridos ácidos y neutros se analizaron por MALDI-TOF-MS en los modos de iones positivos y negativos, como se describe en otra parte (Papac et al, 1996; Papac et al, 1998; Raju et al., 2000) usando un instrumento Voyager DE a partir de Applied Biosystems (Foster City, CA).

El análisis por HPLC de glicanos Fc se hizo por la digestión de muestras de IgG (50 µg) en tampón Tris-HCl de 10 mM (50 µl) pH 7,0 con PNGasa F a 37°C durante 4-8 horas. La derivatización de los oligosacáridos liberados con ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico) se llevó a cabo como se describe (Anumula KR Anal Biochem 2000 Jul 15; 283 (1): 17-26). Brevemente, una solución de acetato de sodio 4% · 3H₂O (p/v) y 2% de ácido bórico (p/v) en metanol se preparó en primer lugar. El reactivo de derivatización fue entonces recién preparado mediante la disolución de ~ 30 mg de ácido antranílico (Aldrich) y ~ 20 mg de cianoboro-hidruro de sodio (Aldrich) en 1,0 ml de solución de acetato-borato de metanol-sodio. Oligosacáridos derivados por IgG (<3 nmol en 20-50 µl de agua) se mezclaron con 0,1 ml de la solución de reactivo de ácido antranílico (AA) en 1,6 ml de viales de congelación de tapón de rosca de polipropileno con anillos 'O' (Sigma) y se tapó herméticamente. Los viales se calentaron a 80°C en un bloque de horno o de calentamiento (Reacti-Therm, Pierce) durante 1-2 horas. Después de enfriar los viales a temperatura ambiente, las muestras se diluyeron con agua para llevar el volumen a ~ 0,5 ml. Oligosacáridos derivatizados fueron purificados usando columnas NAP-5.

Mediante el uso de una preparación que es al menos 90% en la glicofoma G2 o G2S2, un experimento de digestión con papaína como se describe en el ejemplo 1 se realiza y se analiza para demostrar el efecto de contenido de ácido siálico en la velocidad de escisión y la especificidad de la papaína. Los análisis adicionales de escisión se llevan a cabo con otras enzimas proteolíticas utilizando las muestras como se ha preparado en este ejemplo.

Ejemplo 3: Producción de fragmentos de anticuerpos mediante el uso de metaloproteínasa de la matriz 3

Las metaloproteinasas (MMPs) se purificaron a partir del sobrenadante de clones de células que expresan MMP humanos recombinantes. La enzima se activó con 1 mM de 4-acetato aminofenilmercúrico (APMA; Sigma) durante 1 hora a 37°C o por tratamiento con quimotripsina. La enzima activada se almacenó a -70°C. Preparaciones de inmunoglobulina (0,5-1,0 mg/ml) se incubaron con tampón de digestión (250 mM de Tris-HCl, pH 7,4, que contiene 1,5 M NaCl, 50 mM de CaCl₂ que contiene 15-60 µg/ml de MMP activado) durante 0-24 horas a 37°C. Las alícuotas fueron retiradas a los 0, 15, 30, 45, 60, y 120 minutos, seguido de 3, 4, 5, 6, 8, 12, y 24 horas. Las alícuotas fueron (aproximadamente de 2 microlitros) con solución de matriz (aproximadamente 2 microlitros) y 2 microlitros de esta mezcla se cargó en la placa diana MALDI-TOF-MS y se analizaron por MALDI-TOF-MS usando un espectrómetro de Voyager DE.

Ejemplo 4: Escisión proteolítica de Fc purificada

La papaína se obtuvo de Sigma y PNGasa F (péptido de N-glucosidasa F) se obtuvo de New England Biolabs. Ácido sináptico se obtuvo de Fluka. Los análisis de MALDI-TOF-MS se llevaron a cabo utilizando estación de trabajo de Voyager DE Biospectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Muestras de anticuerpo (IgG) se desglicosilaron por tratamiento con PNGasa F en 20 mM de tampón de Tris-HCl, pH 7,0. Las muestras de anticuerpo desglicosiladas se purificaron en una columna de proteína A (cartuchos de proteína A HiTrap se obtuvieron de Amersham Biosciences) y se analizaron por MALDI-TOF-MS para la pureza. Se aislaron los fragmentos Fc de IgG y se purificaron como se describe en otro lugar.

Las muestras de fragmento Fc (aproximadamente 1 mg/ml, antes y después de desglicosilación) fueron tratadas con papaína (1:50, en peso) en 20 mM de tampón de Tris-HCl, pH 7,0, que contenía 2 mM de L-cisteína y alícuotas se retiraron a intervalos de tiempo fijos (0, 15, 30, 60, 90 minutos, seguido de a 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 24 horas). Las partes alícuotas (aproximadamente 2 µl) se mezclaron inmediatamente con 2 µl de solución de matriz (la solución matriz se preparó disolviendo 10 mg de ácido sináptico en 1,0 ml de 50% de acetonitrilo en agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético) y 2 µl de esta solución se cargó en la placa diana MALDI y se dejó secar al aire antes del análisis.

Los datos de MALDI-TOF-MS de digestos de IgG glicosilados y desglicosilados se analizaron para obtener los datos del área de pico % relativos de IgG intactas y fragmentos de Fc a todos los puntos de tiempo (Fig. 5). Para las muestras de IgG, los experimentos en función del tiempo indicaron que dentro de los 15 minutos de la digestión, más del 70% de la IgG desglicosilada fue convertida en Fab, Fc, y los fragmentos de Fc más pequeños (en m/z de fragmentos 10,5 kDa y 12 kDa), mientras que menos de 50% de la IgG glicosilada fue convertida en fragmentos. Después de 60 minutos de incubación, ninguna IgG desglicosilada era detectable, mientras que aproximadamente el 80% de IgG glicosilada estaba todavía intacta de acuerdo con el análisis de MALDI-TOF-MS. Para los fragmentos de

Fc, después de 4 horas de digestión, más del 95% del fragmento de Fc desglicosilada se convirtió en los fragmentos más pequeños de 10,5 y 12 KDa, mientras que no más del 10% de la Fc glicosilada se convirtió en estos fragmentos más pequeños en ese momento. De hecho, casi el 50% de la Fc glicosilada permaneció sin digerir incluso después de 24 h.

Estos datos indican que la IgG glicosilada es significativamente más resistente a la digestión con papaína de la IgG desglicosilada, y que la Fc glicosilada es mucho más resistente que la Fc desglicosilada. El experimento de curso de tiempo también reveló que la cantidad de fragmentos Fab a partir de las IgG desglicosiladas y glicosiladas fueron equivalentes, sugiriendo que sólo los fragmentos de Fc se someten a la digestión excesiva y la conversión en los fragmentos de 10,5 KDa y 12 KDa.

Ejemplo 5: Preparación de mAbs con glicofomas específicas

Para comprender mejor el papel de los oligosacáridos en el aumento de la resistencia de anticuerpo a la papaína, preparaciones de IgG con oligosacáridos homogéneos de G0, G2 y G2S2 se prepararon utilizando métodos *in vitro*.

Preparación de glicofoma G0 Para preparar glicofoma G0 homogénea, muestras de IgG fueron tratadas primero con sialidasa A para eliminar pequeñas cantidades de residuos de ácido siálico terminales, seguido por tratamiento con β -galactosidasa para eliminar de residuos de β -galactosa terminales. Muestras de IgG (10 mg en 1,0 ml) en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) se trataron con 100 miliunidades cada una de sialidasa A (*A. ureafaciens*) y β -galactosidasa (*D. pneumoniae*) durante 24 horas a 37°C. Después de 24 horas, se añadió otra alícuota de enzimas y se incubó durante 24 horas adicionales a 37°C.

Después de la purificación sobre una columna de proteína A, la glicofoma G0 resultante se caracterizó por MALDI-TOF-MS de masa intacta (Fig. 6A). El espectro de masas contenía un ion molecular de carga única en m/z 147,7 KDa, un ion molecular doblemente cargado en m/z 73,9 KDa y un ion molecular triplemente cargado en m/z 49,3 KDa. El espectro de masas también contenía un ion en 23,4 KDa que representa la cadena ligera libre producida durante la ionización con desorción por láser. Estos datos del espectro de masas indicaron que el anticuerpo estaba intacto después del tratamiento con enzimas para modificar los glicanos Fc en oligosacárido G0 homogéneo.

La cadena de oligosacárido modificado, liberada por el tratamiento de las muestras de IgG con PNGasa F, se analizó por MALDI-TOF-MS en el modo positivo usando sDHB como matriz (después de la purificación usando una columna de intercambio catiónico) y también por HPLC (después de la derivatización con ácido antránilico usando un procedimiento de aminación reductora como se describe por Anumula (1998 *supra*). El análisis de MALDI-TOF-MS mostró un ion molecular en m/z 1486,8 que corresponde al peso molecular de oligosacárido biantenarico complejo fucosilado de núcleo sodiado terminado con residuos de GlcNAc. El análisis de HPLC de fase normal de oligosacárido derivatizado de A-A proporcionó un único pico que eluyó a 20,5 min y se corresponde con el tiempo de elución de oligosacárido biantenarico complejo fucosilado de núcleo estándar marcado con A-A terminado con residuos de GlcNAc (datos no mostrados), indicando que la muestra de glicofoma de G0 IgG contenía más de 99% de oligosacárido G0.

Preparación de glicofoma G2 Las muestras de IgG se trataron primero con sialidasa A y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Las muestras de IgG tratadas con sialidasa A (10 mg en 1,0 ml) en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) se trataron con 50 mU de β -1,4GT, 5 μ mol de UDP-Gal, y 5 μ mol de MnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de enzima y UDP-Gal y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37°C.

Después de la purificación sobre una columna de proteína A, la muestra de anticuerpo w tal como se analizó por MALDI-TOF-MS de masa intacta. El espectro de masas mostró un ion molecular sola carga en m/z 148,7 KDa, un ion molecular doblemente cargado en m/z 74,2 KDa y un ion molecular triplemente cargado en 49,5 KDa. El espectro de masas también contenía un ion molecular de carga única en m/z 23,4 KDa debido a la cadena ligera libre producida durante la ionización con desorción por láser. A continuación, la glicofoma G2 se sometió a tratamiento con PNGasa F para liberar los oligosacáridos N-ligados y los oligosacáridos liberados se analizaron por MALDI-TOF-MS en el modo positivo usando sDHB como matriz. El espectro de masas mostró un ion molecular a m/z 1812,1 (Fig. 6B) y este ion molecular a m/z 1812.1 corresponde al peso molecular de oligosacárido biantenarico complejo núcleo sodiado fucosilado terminado con residuos de galactosa. El análisis de HPLC de fase normal de la PNGasa F libera oligosacáridos después de que derivatización con AA mostró un solo pico y el tiempo de elución de este pico corresponde al tiempo de elución de oligosacárido de G2 estándar lo que indica que la preparación de glicofoma G2 contenía molécula de IgG intacta, con más de 99 % de oligosacárido G2.

Preparación de glicofoma G2S2 Para la preparación de glicofoma G2S2, muestras de anticuerpo fueron tratadas con una mezcla de β -galactosiltransferasa y α 2,3-sialiltransferasa en presencia de UDP-Gal, CMP-NANA y MnCl₂ en un solo paso. Muestras de IgG se aplicaron en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) (10 mg en 1,0 ml) usando columnas NAP-5 acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. A esta solución, se añadieron 50 miliunidades cada uno de β 1,4GT y α 2,3ST y 5 μ mol cada uno de UDP-Gal, CMP-Sia, y MnCl₂. La mezcla se incubó a 37°C.

Después de 24 horas, otra alícuota de enzimas se añadió junto con los azúcares de nucleótidos y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37°C.

El análisis de MALDI-TOF-MS de la muestra tratada con enzima, después de la purificación sobre una columna de proteína A, mostró un ion molecular de carga única en $m/z \sim 148,8$ KDa, un ion molecular doblemente cargado en $m/z \sim 74,3$ KDa y un ion triplemente cargado molecular a $m/z \sim 49,5$ KDa (Fig. 6C) lo que sugiere que el anticuerpo estaba intacto y el tratamiento enzimático no alteró la estructura primaria del anticuerpo. El modo negativo MALDI-TOF-MS y análisis por HPLC de la oligosacárido de PNGasa F liberada (Figs. 7A-D) mostraron que el anticuerpo contenía más que 85% de glicofoma G2S2 junto con cantidades menores de estructura G2S1 (estructuras monosialiladas). Además, el 99% de los glicanos Fc contenía al menos un residuo de ácido siálico. Fig. 7A muestra el control (Voyager Spec # 1 => NF0.7 => NR (2,00) [BP = 1485,0, 6636]), Fig. 7B muestra la glicofoma G2 (Voyager Spec # 1 => NF0.7 => NR (2,00) [BP = 1811,4, 5403]), Fig. 7C muestra la glicofoma G0 (Voyager Spec # 1 => NF0.7 => NF0.7 => NR (2,00) [BP = 1486,5, 7006]), y la Fig. 7D muestra la glicofoma G2S2 (modo -ve) (Voyager SpE.C. # 1 => NF0.7 [BP = 2385,4, 2769]).

Cromatografía de exclusión por tamaño Para evaluar las cantidades de agregados presentes en las muestras de anticuerpos antes y después de modificación *in vitro* de las estructuras de glicano, las muestras de Ab se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño usando un sistema de Agilent 1100 HPLC (Agilent). A TOSO HAAS TSK 3000SWXL (Tosoh Biosep LLC) 7,8 mm X 30 cm, 5 μ m de columna se utilizó a temperatura ambiente. La fasa móvil fue una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y la tasa de flujo fue de 0,5 ml/min. Las preparaciones de glicofomas de IgG modificadas exhiben perfiles cromatográficos similares al perfil de anticuerpo de control que indica que los procedimientos de modificación no crean ninguna agregación adicional y/o cambio en la estructura primaria de la proteína.

25 Ejemplo 6: Digestión de papaína de mAbs con glicofomas específicas

Para evaluar la resistencia relativa de glicofomas G0, G2 y G2S2 a la escisión de papaína, las glicofomas de IgG y una muestra de control se trataron con papaína en presencia de cisteína a 37°C durante un período de 24 horas y las digestiones se analizaron por MALDI-TOF-MS.

Las glicofomas G0, G2 y G2S2 junto con las muestras de IgG de control fueron tratadas con papaína a 1:50, relación enzima a sustrato a 37°C. A partir de estas reacciones, alícuotas a 0, 15, 30, 60 y 90 minutos, y a 2, 3, 4, 5, 6, 8, y 24 horas se examinaron mediante MALDI-TOF-MS. Todas las tres glicofomas IgG junto con la muestra de anticuerpo de control se escindieron en fragmentos Fab y Fc, como se evidencia por la presencia de iones moleculares en $m/z \sim 47,3$ y $\sim 52,5$ KDa para los fragmentos Fab y Fc, respectivamente (Fig. 8).

Una comparación de la altura del pico de IgG intacta observada a $m/z \sim 147,5$ KDa se muestra en la Fig. 9. El pico de IgG intactas en $m/z 147,5 \sim$ KDa se midió de 0 a 120 minutos, sin embargo, después de 2 horas, se observó muy poco pico de IgG intacta. A 0 minutos, se observó que era el mismo el pico de altura de todas las glicofomas de IgG junto con la IgG de control. A los 15 minutos, aproximadamente el 50% de G0, 45% del control y 35% de glicofoma G2 permanecieron sin digerir. En contraste, sólo el 25% de glicofoma G2S2 permaneció sin digerir. A los 30 minutos, aproximadamente el 45% de glicofoma G0, 40% de anticuerpo de control y $\sim 20\%$ de glicofoma G2 permaneció sin digerir, mientras que sólo aproximadamente el 10% de glicofoma G2S2 permaneció sin digerir. Por lo tanto, los datos presentados en la Fig. 9 sugieren que la glicofoma G0 es más resistente a la escisión por papaína en el dominio CH1, que produce fragmentos Fab y Fc como los productos primarios, que las otras glicofomas.

Además del sitio de escisión de la papaína primario en el dominio CH1, IgG también pueden someterse a escisión secundaria en el dominio CH2 de la Fc por la reducción de la papaína. Para examinar la resistencia de glicofomas de IgG a digestión con papaína en el sitio de corte secundario, se compararon las alturas de los picos de fragmentos de Fc observados a $m/z \sim 52,5$ KDa. Los datos de altura de pico de los fragmentos de Fc de G0, G2, G2S2 e IgG de control se muestran en la Fig. 10. La altura de pico relativa de fragmentos de Fc de G2 y G2S2 de 0,25 horas (15 minutos) a 1 hora fue de aproximadamente 5% más de la altura de pico relativa de glicofoma G0; las alturas de los picos de los fragmentos de Fc de glicofoma G0 e IgG de control fueron casi similares. Así, tanto IgG intacta como G2 como glicofomas G2S2 y el propio producto Fc que comprende estas glicofomas son más sensibles a la digestión por la papaína. Los datos mostrados en la Fig. 10 ejemplifica, por lo tanto, las tasas de competencia de la formación y la degradación del producto Fc: a 1,5 horas, las alturas de los picos de los fragmentos de Fc de todas las glicofomas y la IgG de control fueron casi iguales. Después de 1,5 horas, las alturas de los picos de los fragmentos de Fc de las glicofomas G2 y G2S2 fueron gradualmente menos de la altura del pico de los fragmentos de Fc de la glicofoma G0 e IgG de control. A las 6 horas, la altura del pico de la glicofoma G2S2 fue de aproximadamente 30% menos que la altura del pico de la glicofoma G0; la altura del pico de glicofoma G2 era aproximadamente un 25% menos que la altura del pico de la glicofoma G0. A las 8 horas, la altura del pico del fragmento de Fc de la glicofoma G2S2 fue de aproximadamente 60% menos que la altura del pico fragmento de Fc de la glicofoma G0; la altura del pico del fragmento de Fc de la glicofoma G2 fue de aproximadamente 50% menos que la altura del pico fragmento de Fc de la glicofoma G0. Después de 0,5 horas de digestión, en todos los puntos de tiempo la altura del pico fragmento de Fc de G0 era mayor que los de G2, G2S2 e IgG de control. A las 24 horas,

no se observaron fragmentos de Fc apreciables para las glicofomas G2 y G2S2, mientras que aproximadamente el 70% de los fragmentos de Fc de G0 e IgG de control fueron observados. Estos datos indican que el fragmento de Fc de la glicofoma G0 es más resistente a la digestión con papaína en el sitio de corte secundario presente en el dominio CH2 de la Fc. Además, los datos también sugieren que la glicofoma G2S2 es el más sensible de las glicofomas tanto para la digestión primaria en el dominio CH1 como la digestión secundaria en el dominio CH2.

Estos datos sugieren que la glicofoma G2S2 puede ser más sensible a la digestión de papaína y la glicofoma G0 puede ser más resistente a la digestión con papaína de la glicofoma G2. La glicofoma G2 era más resistente a la digestión con papaína de la glicofoma G2S2, pero aproximadamente el 50% menos resistente que la glicofoma G0. Estos resultados sugieren que hubo sensibilidad diferencial de glicofomas IgG frente a la digestión con papaína. Estas diferencias en la sensibilidad parecen estar tanto en el sitio de escisión primaria, como en el sitio de corte secundario en la Fc.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RAJU, T. SHANTHA
SCALLON, BERNARD J.

<120> MÉTODOS Y CONFORMACIONES ESTRUCTURALES DE PREPARACIONES DE ANTICUERPOS CON RESISTENCIA MAYOR A LAS PROTEASAS

<130> CEN5195PCT

<140> PENDIENTE DE ASIGNACIÓN
<141> 2008-09-26

<150> 60/976012
<151> 2007-09-28

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1          5          10          15
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                20
    
```

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 1          5          10          15
Gly
    
```

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 637 918 T3

5 Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10 15
Leu Gly

<210> 4
<211> 13
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

15 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
1 5 10

20 <210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 5

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10

30 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 6

40 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una preparación de proteína que contiene Fc de IgG glicosilada, en la que uno o más residuos de Fc en la región CH2 de la proteína que contiene Fc glicosilada se mutan para mantener o para aumentar las interacciones hidrófobas y disminuir las interacciones hidrófilas en las regiones CH2 o CH3 en que las mutaciones son Lys 246 Ala, Thr 260 Ala, y/o Arg 301 Ala.
- 10 **2.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que las interacciones hidrófilas están entre residuo de galactosa en el α -1,6-brazo y aminoácido reside en el dominio CH2.
- 3.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que las interacciones hidrófilas están entre los residuos de ácido siálico y residuos de aminoácidos en el dominio CH2.
- 15 **4.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que la proteína que contiene Fc contiene glicoformas G0 sin las interacciones hidrofílicas entre los residuos de azúcar de la galactosa y los residuos de aminoácidos en las regiones CH2.
- 5.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que la proteína que contiene Fc contiene glicoformas G0.
- 20 **6.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que la proteína que contiene Fc contiene glicoformas G0 y las interacciones hidrófobas mantenidas entre cadenas laterales Fc y residuos de azúcar de la cadena principal de oligosacáridos son las interacciones de hidratos de carbono en hidratos de carbono e interacciones de hidratos de carbono en proteínas .
- 25 **7.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 1, en la que la proteína que contiene Fc es un anticuerpo.
- 8.** La preparación de proteína que contiene Fc glicosilada de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal terapéutico
- 30 **9.** La preparación de proteína glicosilada que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que la proteasa se selecciona de entre el grupo constituido por pepsina, una metaloproteinasa de matriz, tripsina, quimotripsina, y una enzima de modificación de glicosilación.
- 35 **10.** La preparación de proteína glicosilada que contiene Fc de la reivindicación 9, en la que la metaloproteinasa de matriz se selecciona del grupo constituido por la metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7), elastasa de neutrófilos (HNE), estromelisina (MMP-3), y elastasa de macrófagos (MMP-12).
- 40 **11.** La preparación de proteína glicosilada que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que las mutaciones son Lys246 Ala y Thr260 Ala.

45

50

55

60

65

Figura 1

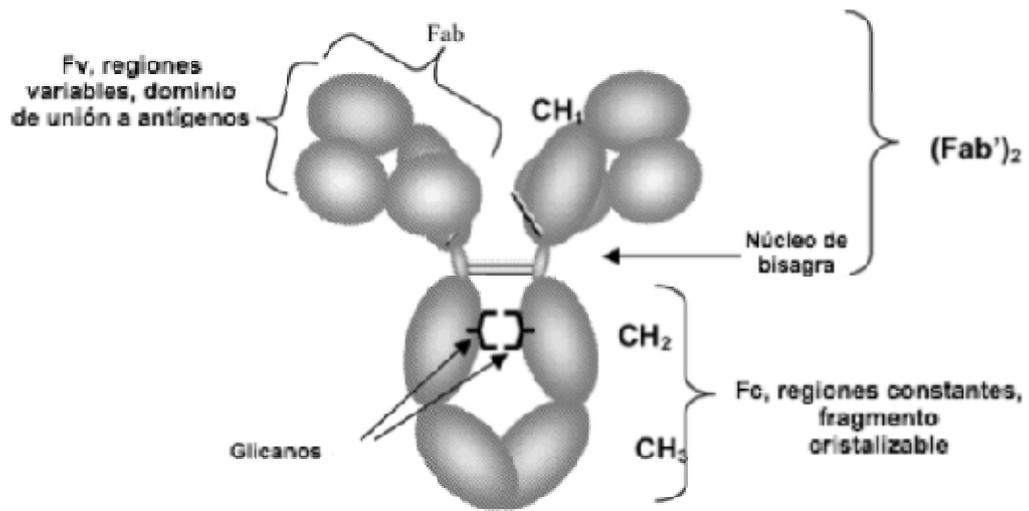
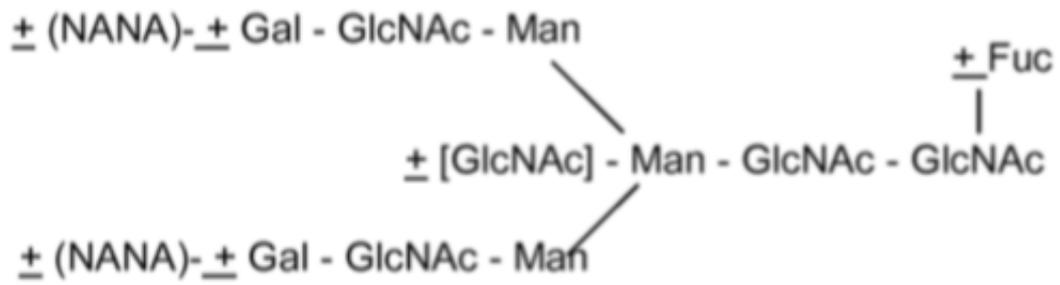


Figura 2



Variantes de glicofoma de anticuerpos

Glicoformas específicas con su designación respectiva

Fuc = fucosilo; Gal = galactosilo; Glc = glucosilo; GlcNAc = N-acetilglucosaminilo; Man = manosilo; y NANA* = sialilo (N-acetilneuraminilo).

Figura 3

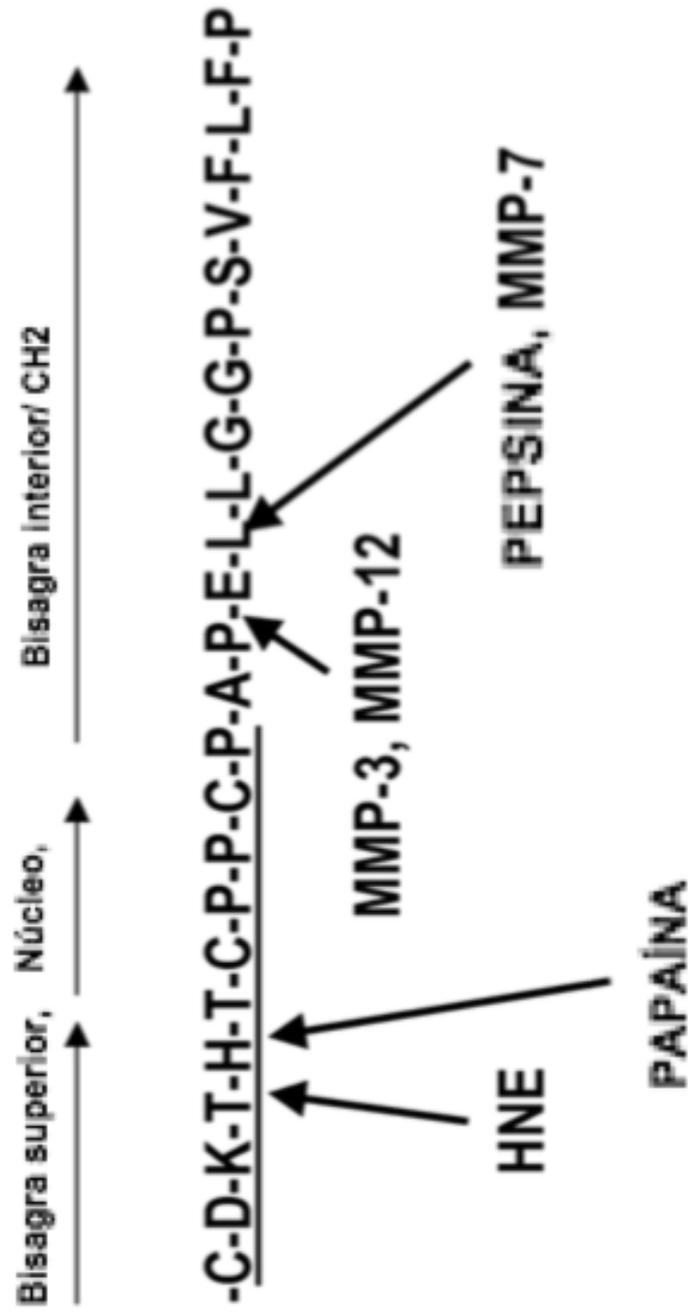


Figura 4A

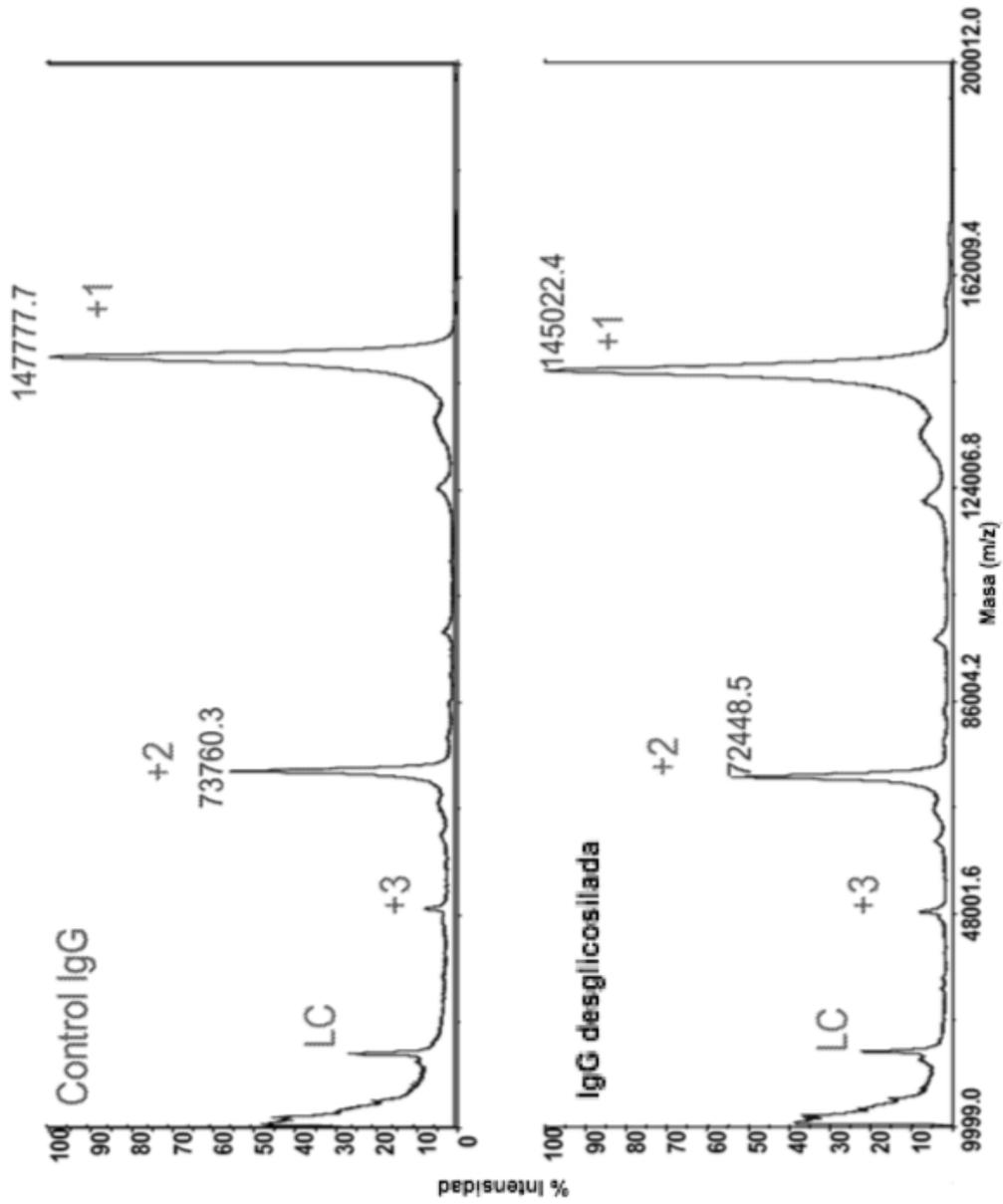


Figura 4B

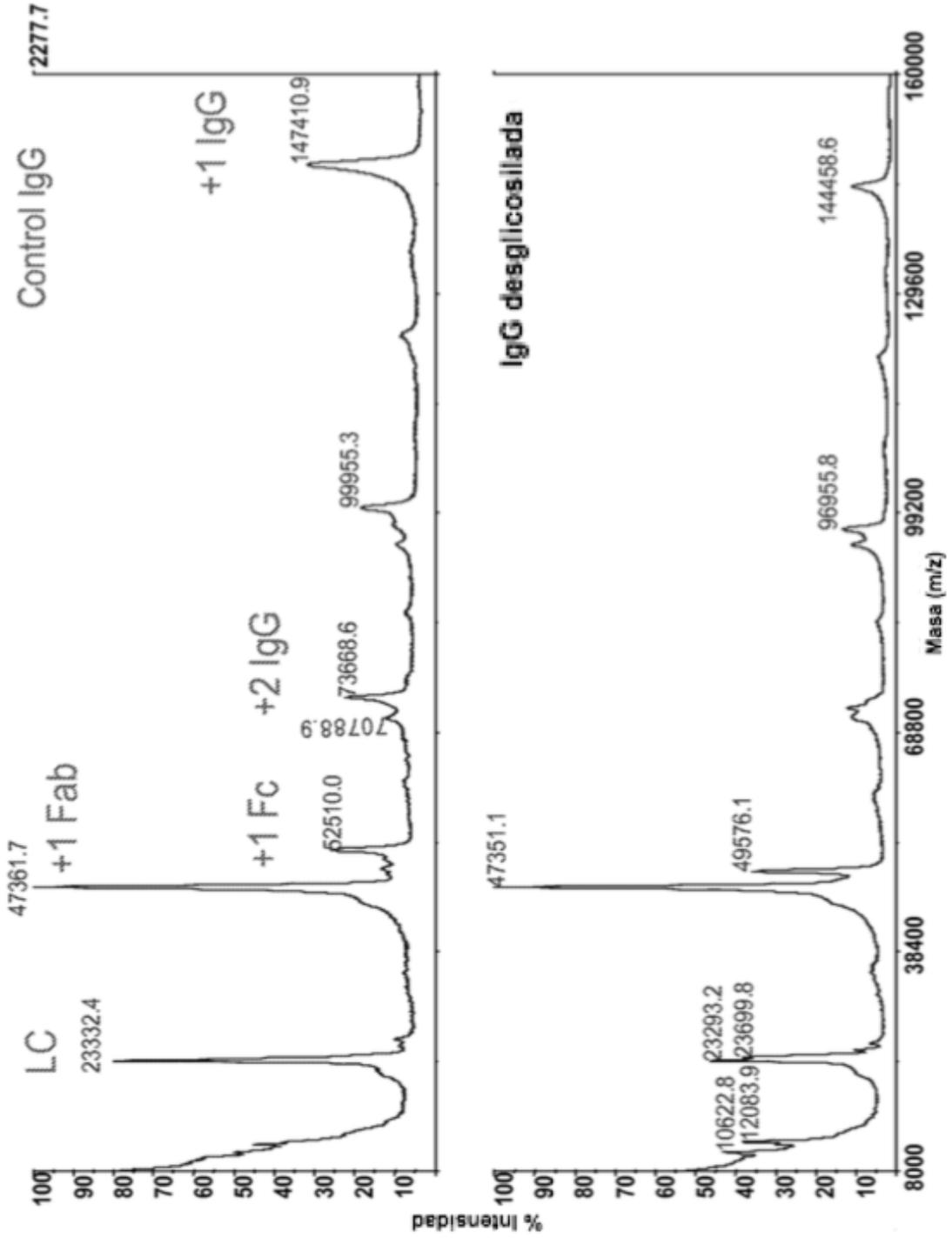


Figura 4C

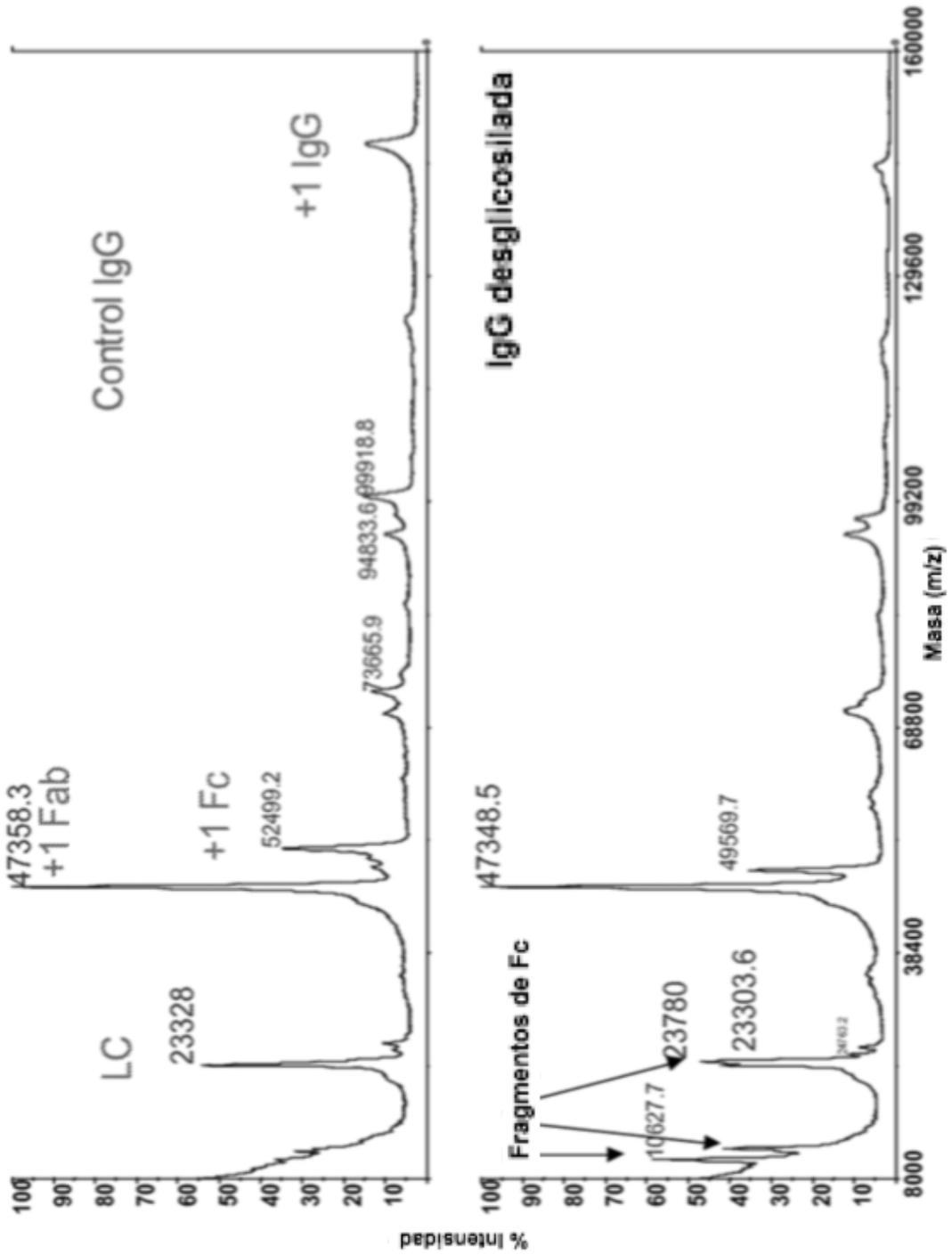


Figura 4D

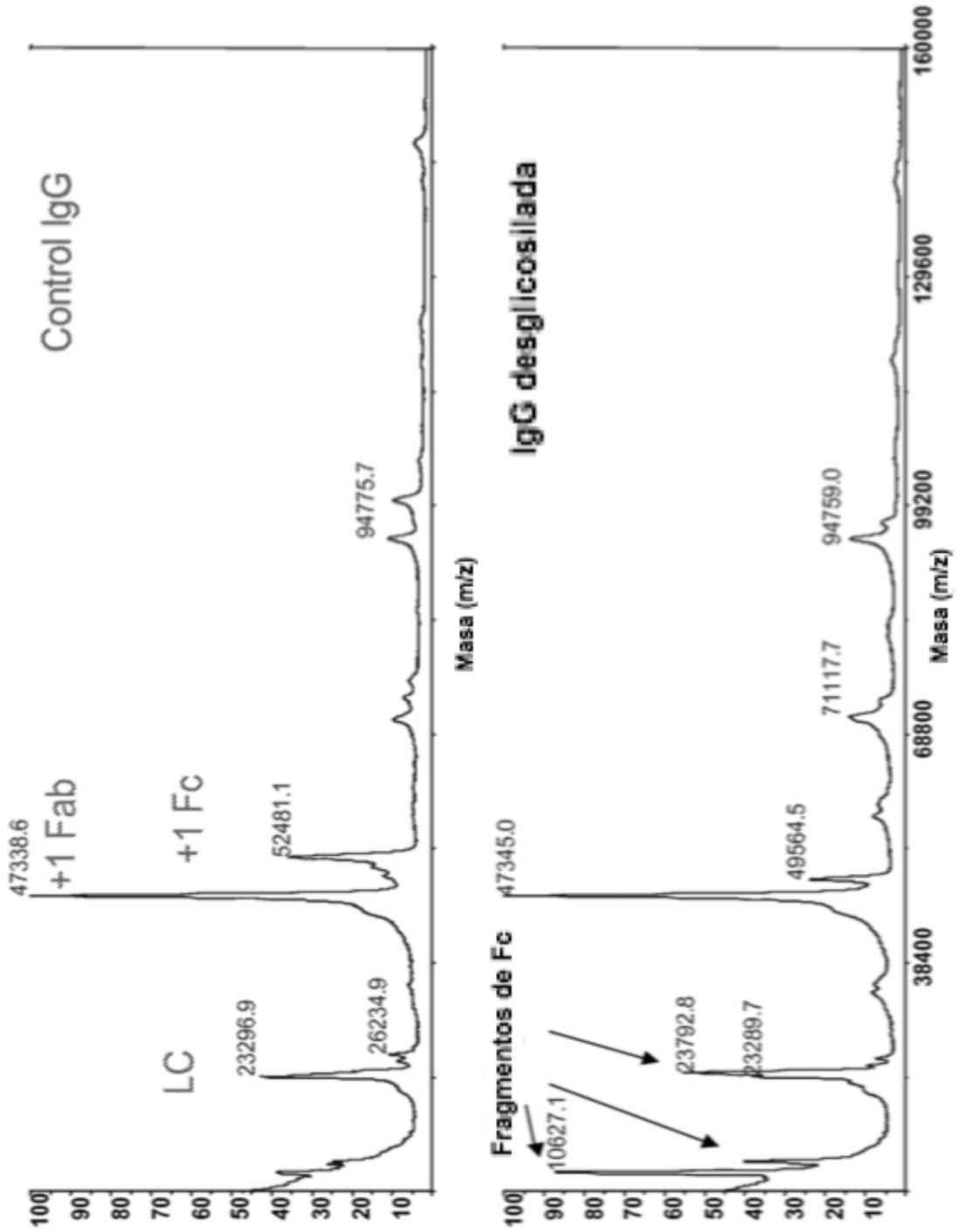


Figura 4E

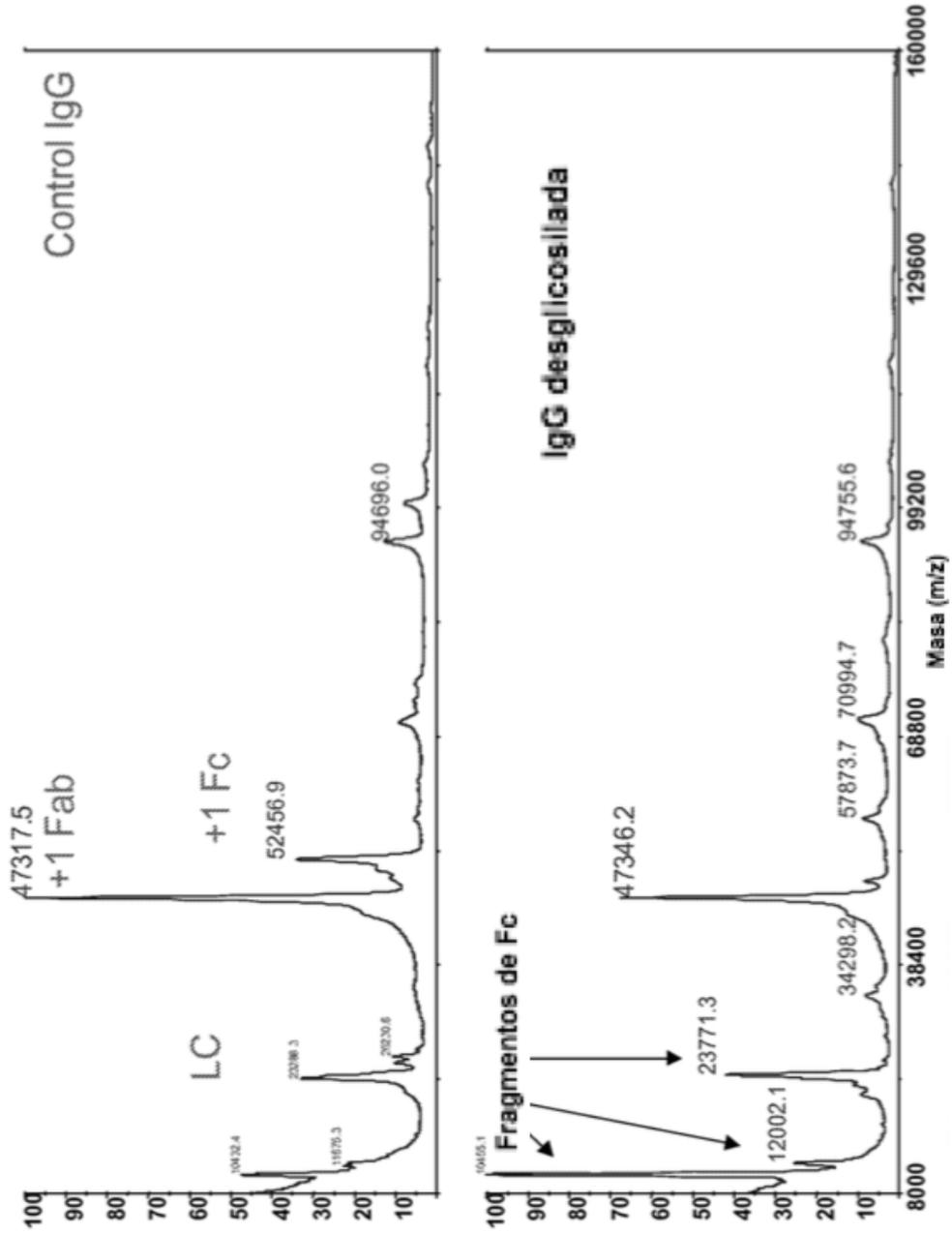


Figura 4F

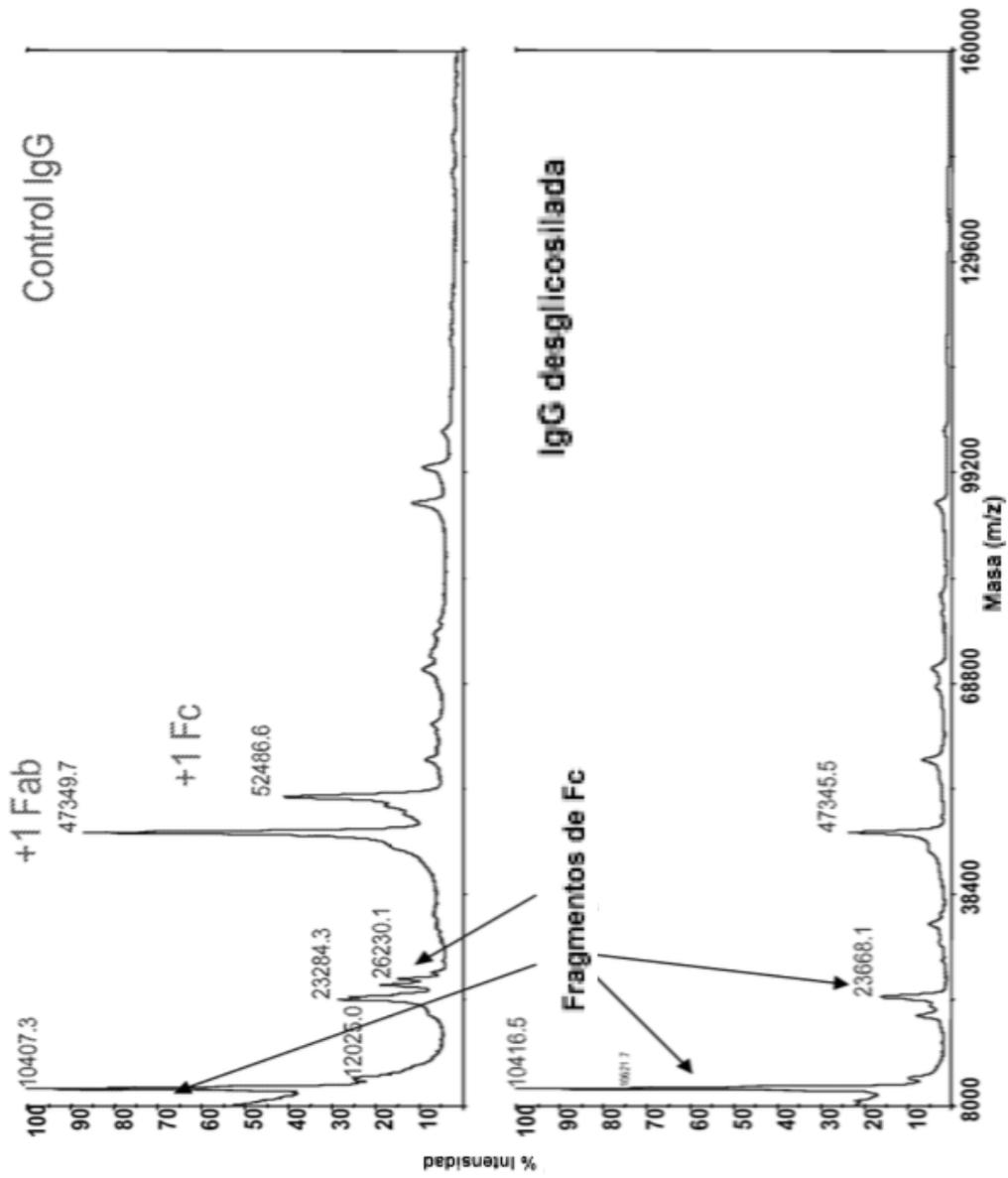


Figura 4G

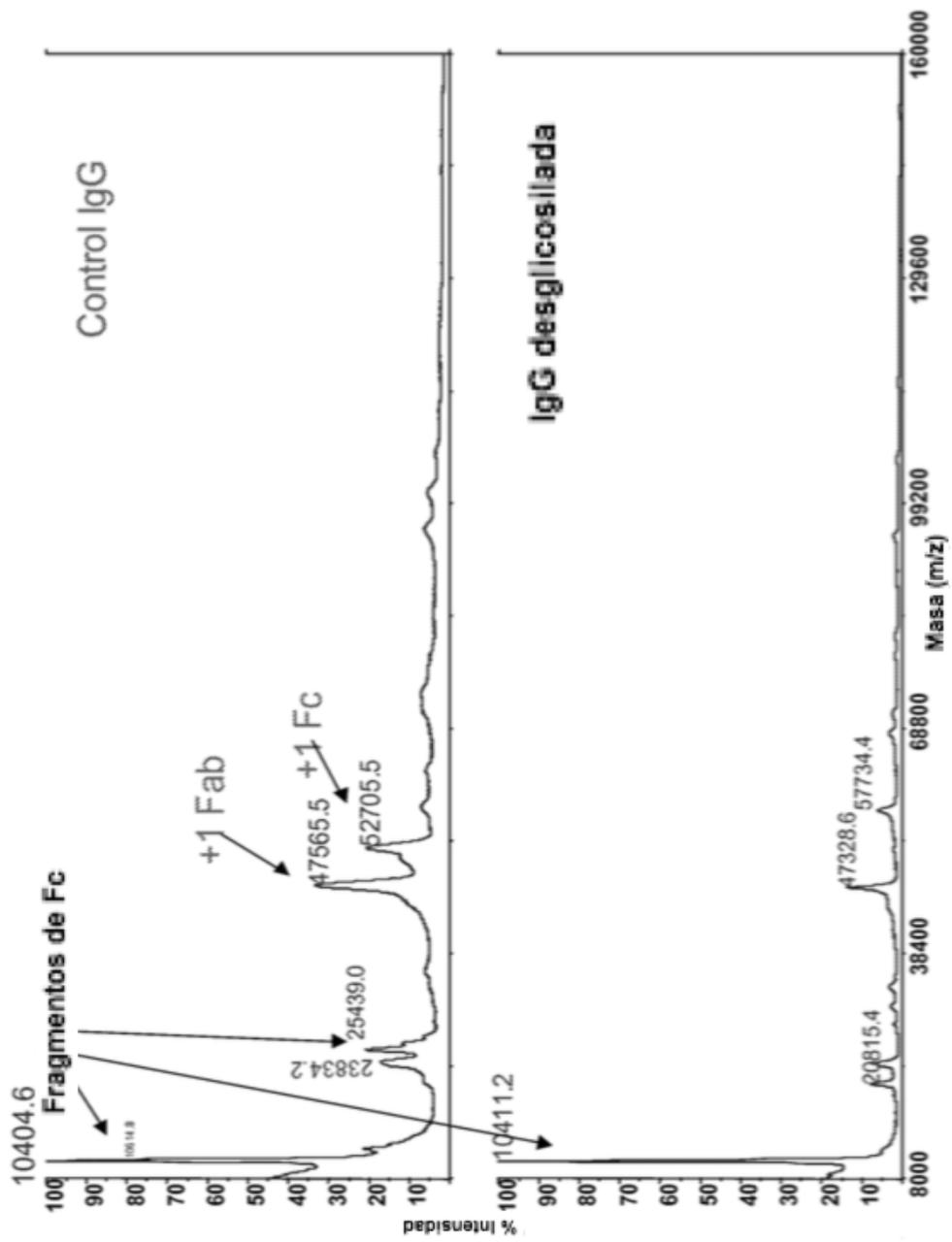


Figura 5

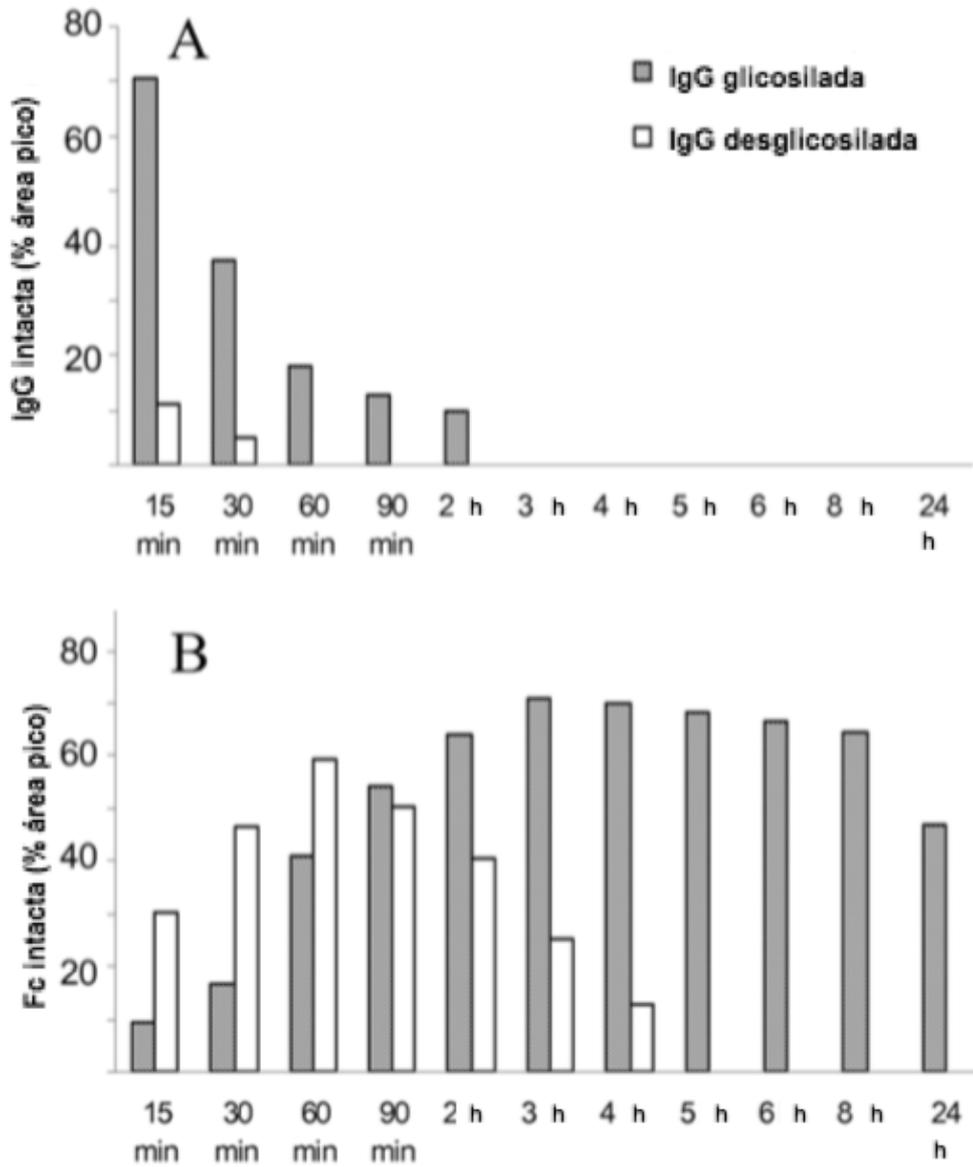


Figura 6

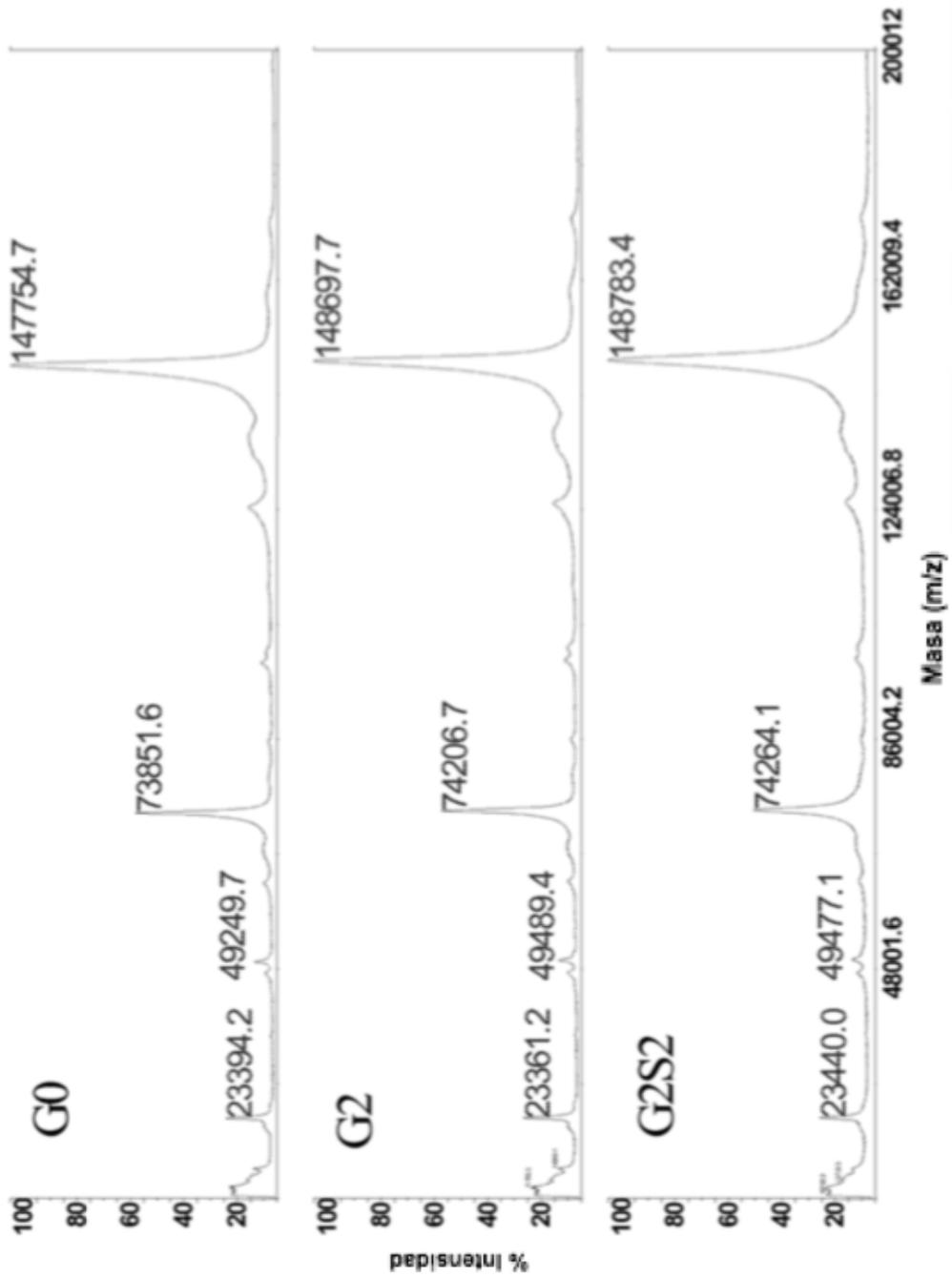


Figura 7A

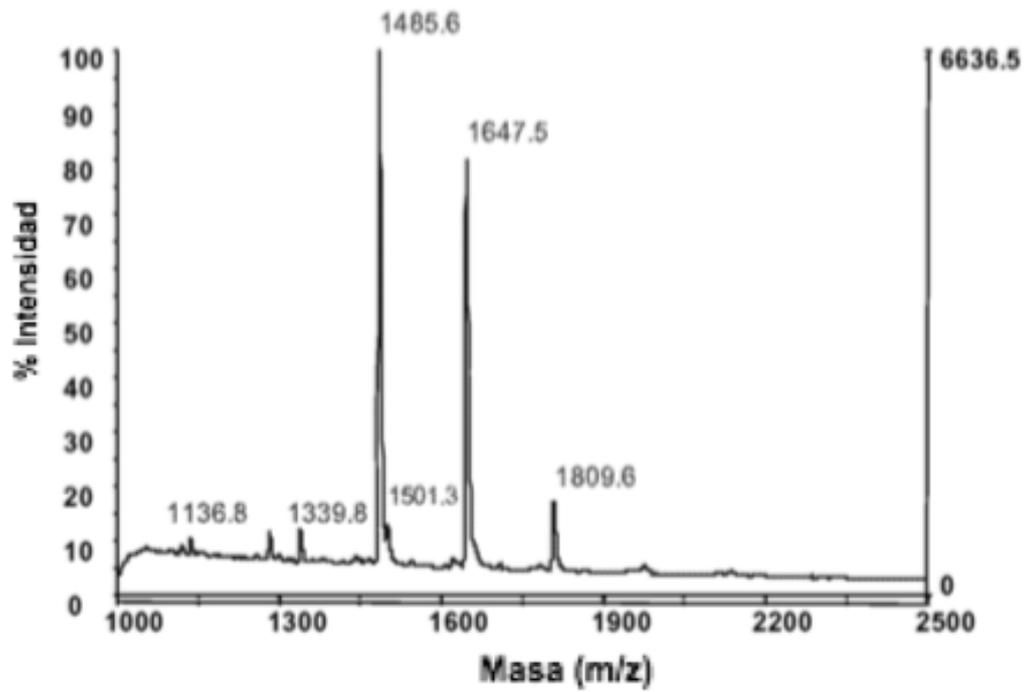


Figura 7B

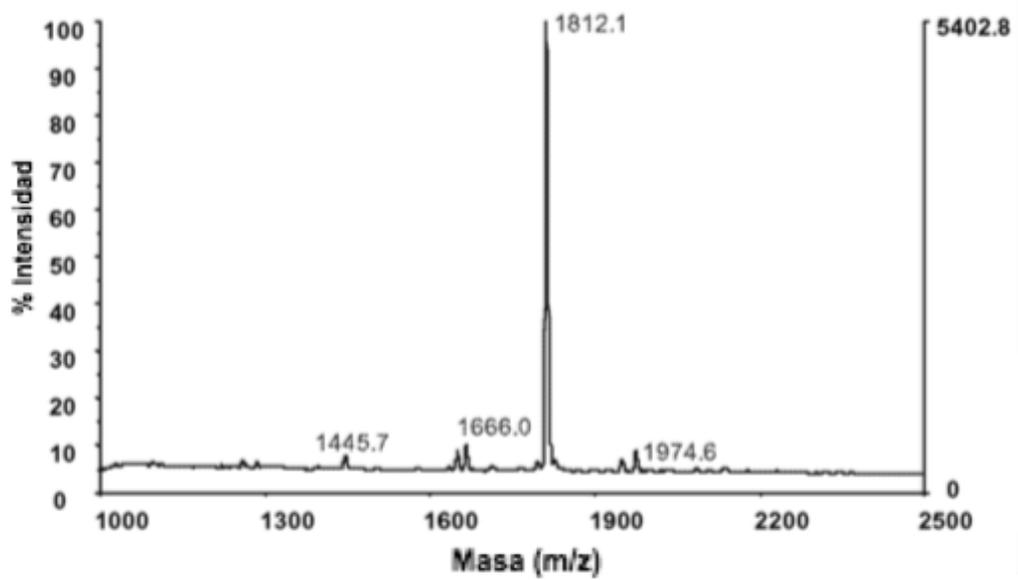


Figura 7C

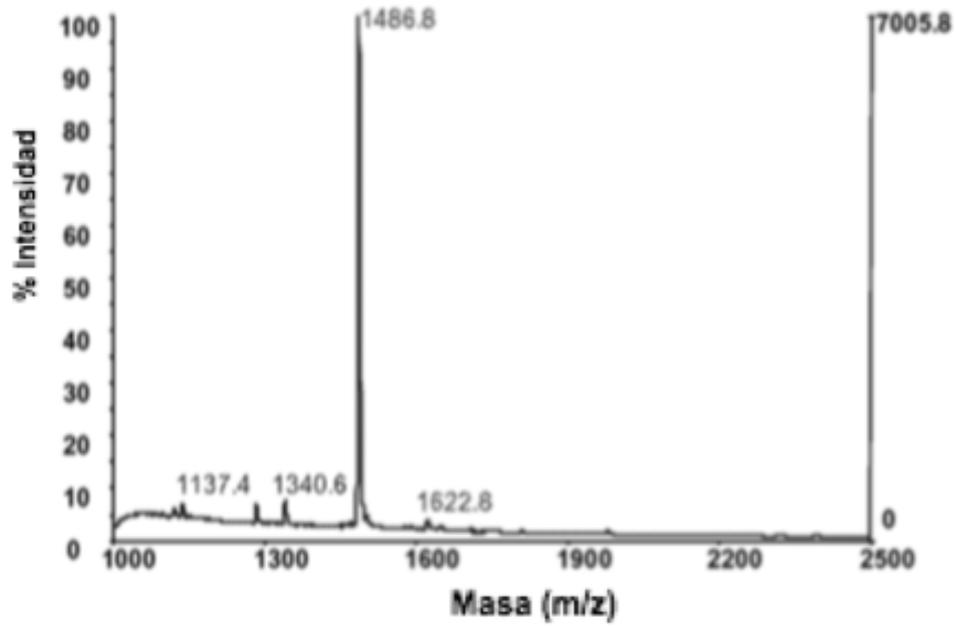


Figura 7D

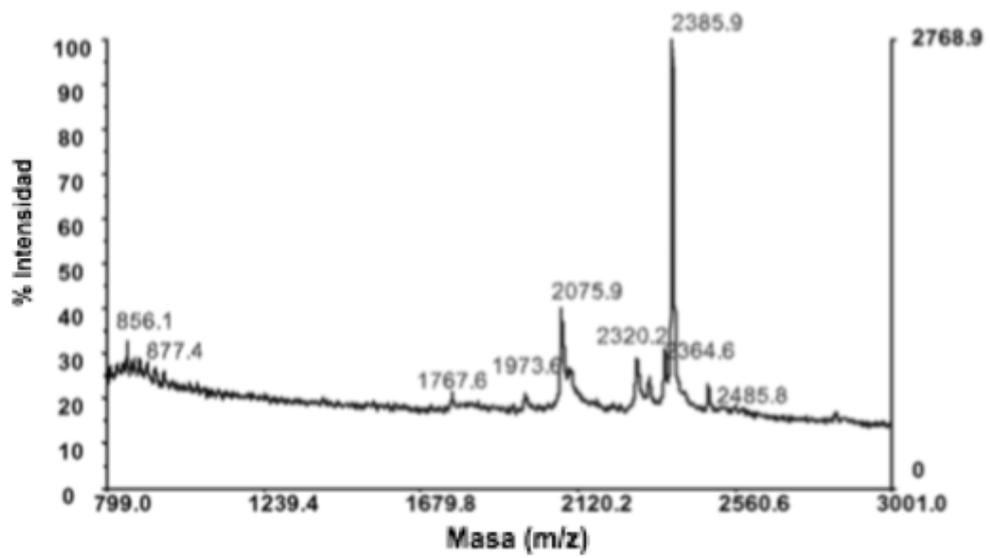


Figura 8

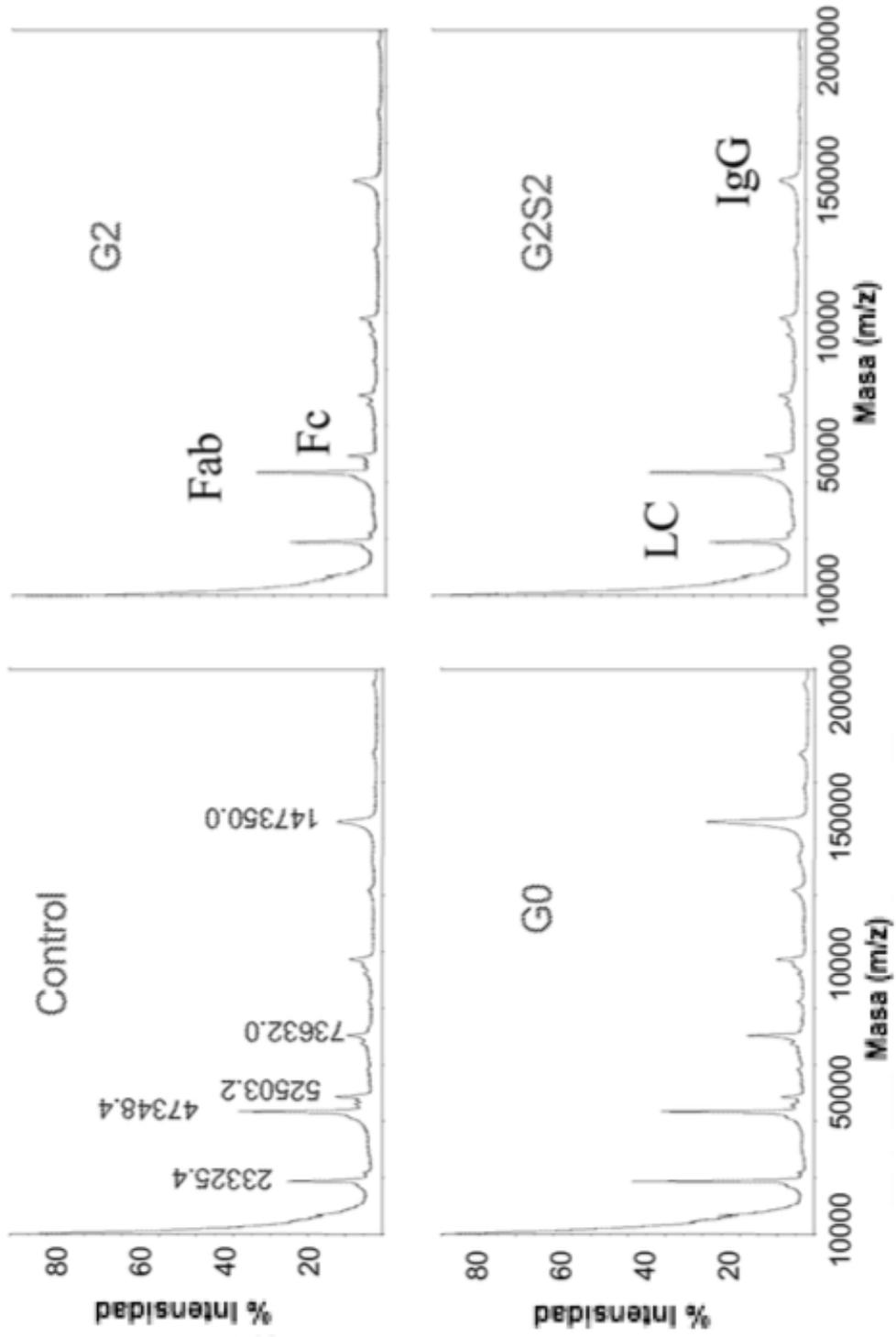


Figura 9

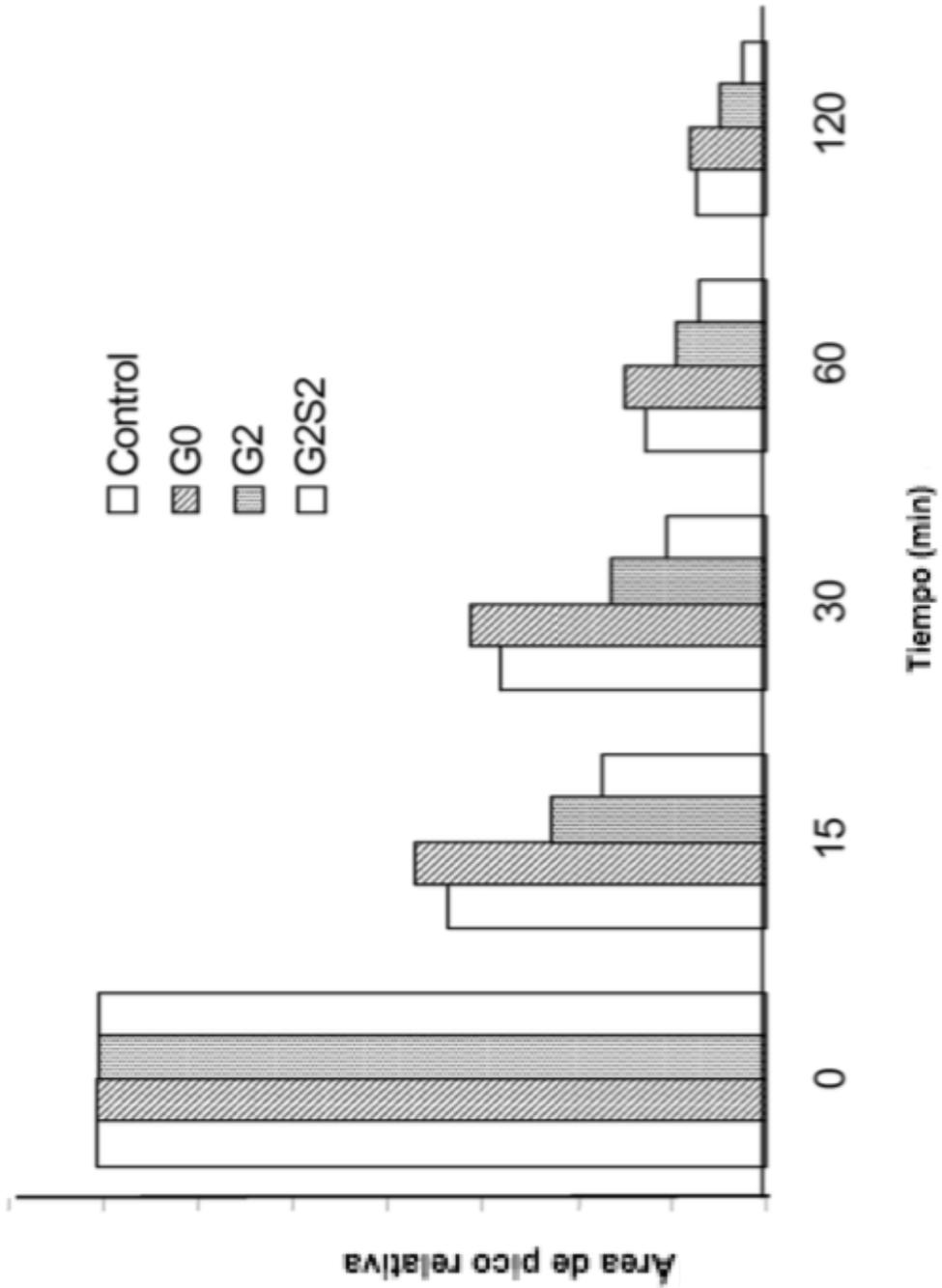


Figura 10

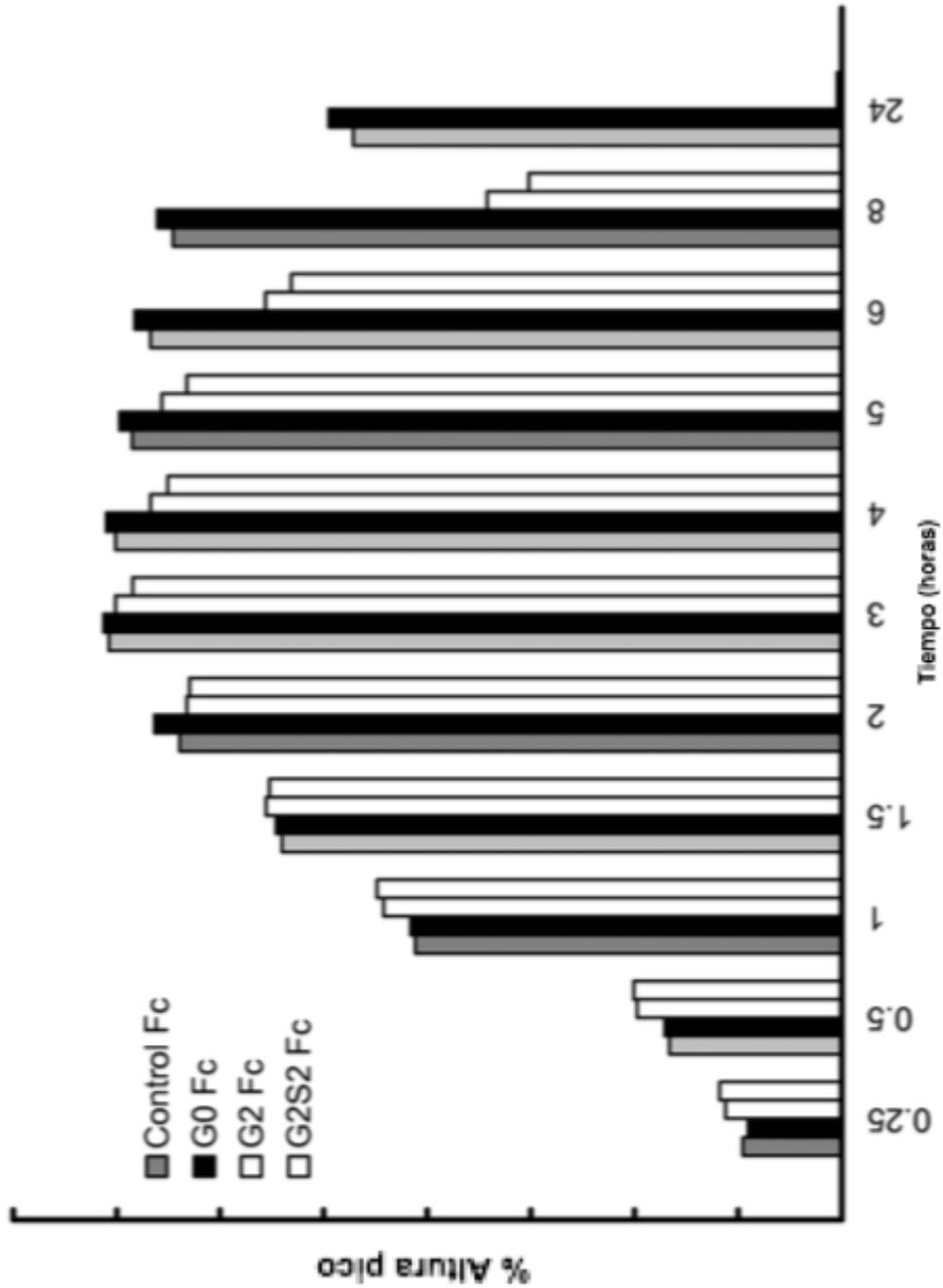


Figura 11

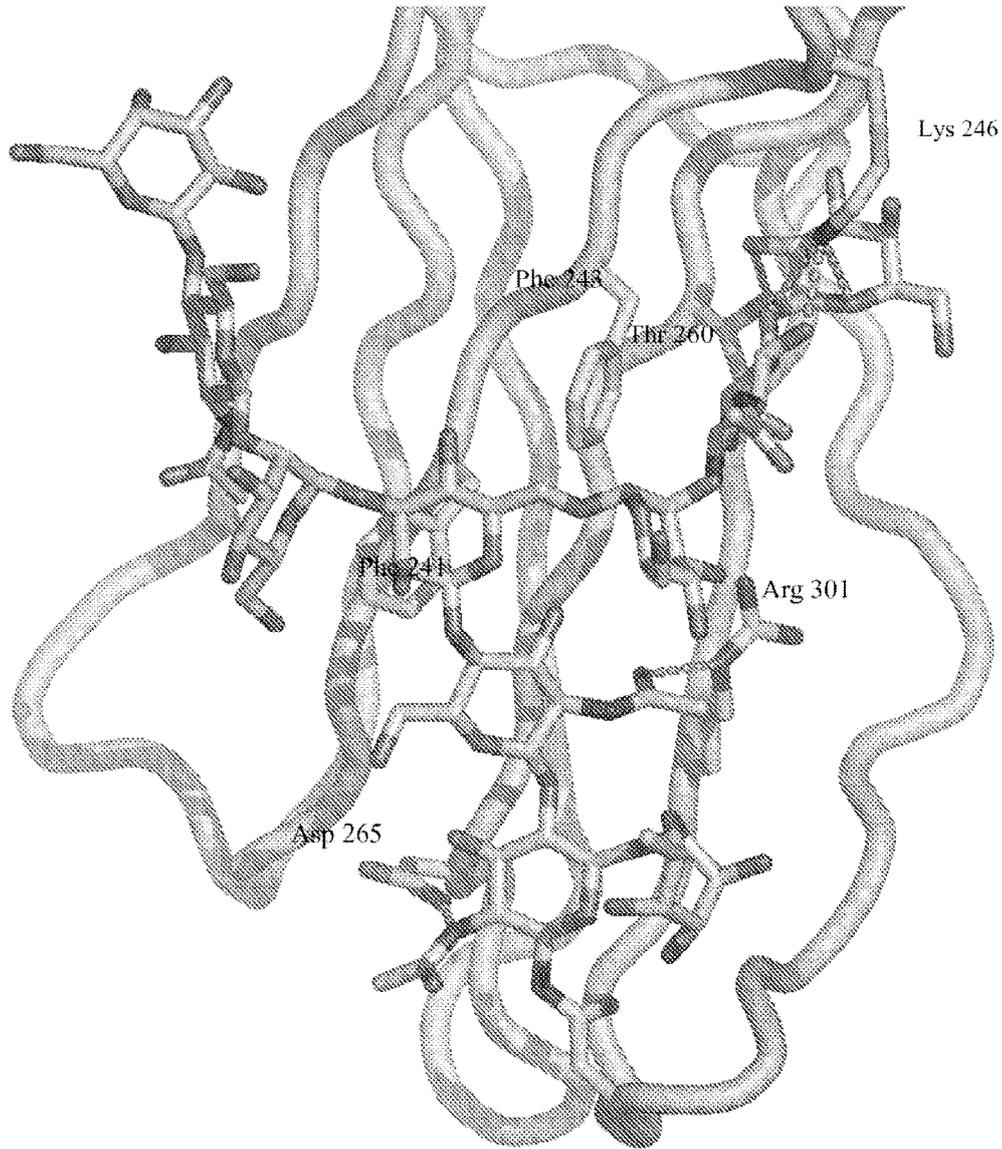


Figura 12

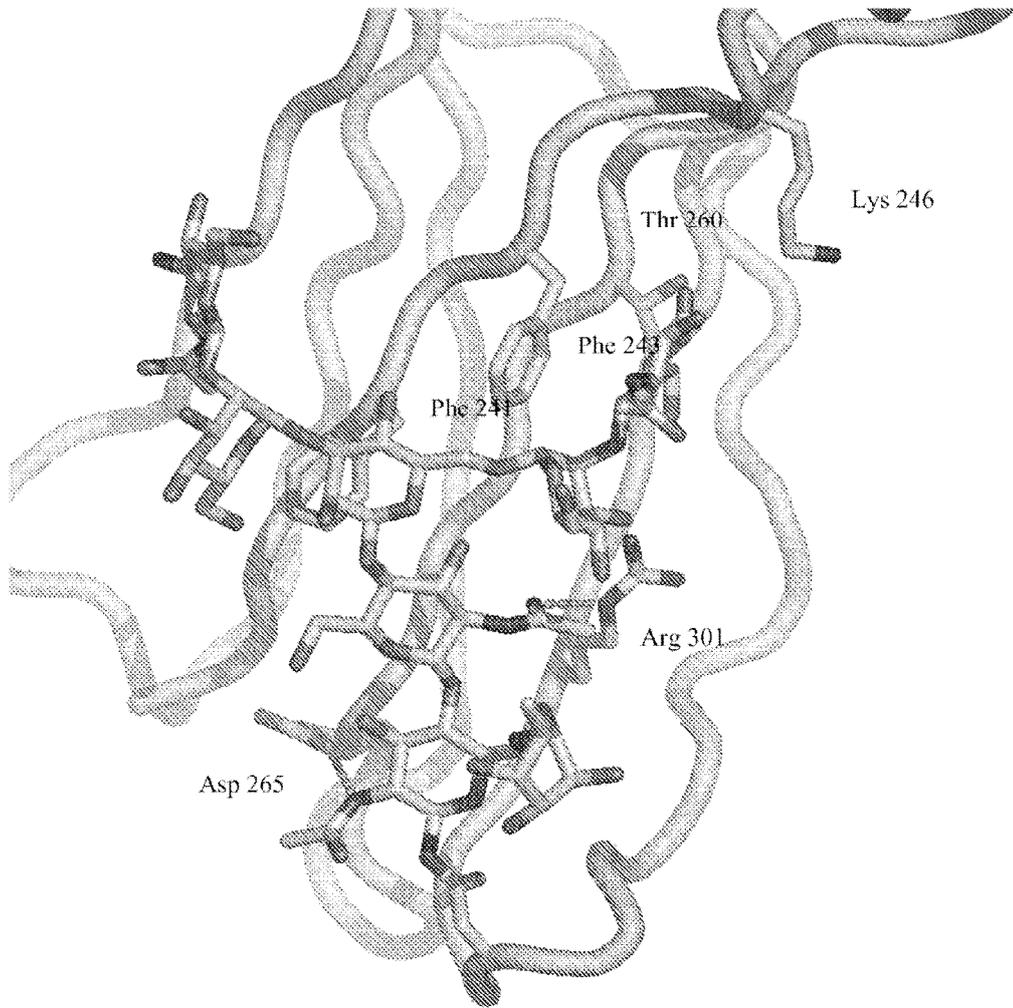


Figura 13

