

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 787**

51 Int. Cl.:

C07K 16/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2006** **E 11167183 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2388273**

54 Título: **Anticuerpos con actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mejorada, métodos para su producción y uso**

30 Prioridad:

21.10.2005 US 729054 P

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

20.11.2017

73 Titular/es:

**LFB USA, INC. (50.0%)
175 Crossing Boulevard
Framingham, MA 01702, US y
GENZYME CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHINDLER, DANIEL;
MEADE, HARRY M;
EDMUNDS, TIMOTHY y
MCPHERSON, JOHN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 787 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos con actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mejorada, métodos para su producción y uso

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención de refiere a anticuerpos con actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC – siglas en inglés) mejorada, métodos para su producción así como métodos para su uso.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticuerpos monoclonales son un arma importante en el arsenal de terapias contra enfermedades. Por ejemplo, ADCC es un contribuyente principal a la eficacia de anticuerpos anti-cáncer. El receptor clave que media en la ADCC es el receptor FcγIIIa (CD16), un receptor de baja afinidad para IgG expresado en células asesinas naturales (NK – siglas en inglés). Ratones deficientes para este receptor tienen una respuesta anti-tumor significativamente menor a rituximab (Clynes et al., 2000, Nat. Med 6: 443-446). El receptor FcγIIIa juega un papel en mediar en la citotoxicidad de tumores en ratones (Clynes et al., 1998, PNAS 95: 652-656). Un polimorfismo del gen FCGR3A que codifica el receptor FcγIIIa, que tiene una valina en la posición 158 en lugar de una fenilalanina, se une a IgG de manera más estrecha y confiere una actividad de ADCC mejorada en células NK (Wu et al., 1997, J Clin Invest 100: 1059-1070). Este genotipo del gen FCGR3A, FCGR3A-158V/V, tiene un efecto positivo sobre la respuesta de los pacientes a rituximab en linfoma no-Hodgkin (Cartron et al., 2002, Blood 99: 754-758), macroglobulinemia de Waldenstrom (Treon et al., 2005, J Clin Oncol 23: 474-481), y la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico (SLE – siglas en inglés) (Anolik et al., 2003, Arthritis Rheum 48, 455-459). El mismo polimorfismo ha sido también correlacionado con una mejor respuesta biológica en la enfermedad de Crohn a otro anticuerpo, infliximab (Louis et al., 2004, A Phar Ther 19: 511-519). Estos hallazgos ilustran que ADCC juega un papel importante en la acción terapéutica de anticuerpos monoclonales en seres humanos. El aumento de la capacidad de anticuerpos terapéuticos para facilitar la actividad de ADCC, por lo tanto, tiene un valor terapéutico potencial.

30

Los anticuerpos humanos tienen dos sitios de glicosilación, uno en cada una de las cadenas pesadas idénticas. Experimentos iniciales utilizando inhibidores de la glicosilación y el procesamiento de hidratos de carbono encontraron que anticuerpos producidos en clones de hibridoma inhibidos tienen una actividad de ADCC mejorada (Rothman, 1989). Un trabajo adicional demostró que tanto el estado de glicosilación como la actividad de ADCC de un anticuerpo se ven afectados por la línea celular en la que se produjo el anticuerpo (Lifely, 1995). Varios grupos de investigación han demostrado que anticuerpos que carecen de la 1,6-fucosa en su glicosilación de la cadena pesada, tienen una afinidad de unión mejorada al receptor FcγRIII y una actividad incrementada de ADCC (Shields et al., 2002; Shinkawa et al, 2002). Además, se ha establecido una correlación entre la afinidad de unión al receptor FcγRIII y la actividad de ADCC (Okazaki, 2004; Dall'Ozzo, 2004).

40

Se han generado líneas de células que son deficientes para "FUT8", alfa-1,6-fucosiltransferasa, que cataliza la transferencia de esta fucosa. Estas células inactivadas se pueden utilizar para producir anticuerpos con una mayor actividad de ADCC. Por ejemplo, se ha establecido una célula de ovario de hámster chino (CHO – siglas en inglés) deficiente en FUT8 (Yamane-Ohnuki et al., 2004). También se ha utilizado ARN interferente pequeño (ARNsi) para bloquear la expresión del gen FUT8 (Mori et al., 2004). Se ha utilizado una línea de células de rata para producir anticuerpos con actividad incrementada de ADCC (Niwa et al., 2004, 2005). Además de su mayor actividad, IgG1 con bajo contenido en fucosa es independiente del polimorfismo FcγRIII, careciendo con ello de la diferencia observada con trastuzumab o rituximab en la célula de tipo salvaje (Niwa et al., 2004b, Vol 10 Clin Canc Res).

45

Incluso a pesar de que se han producido previamente anticuerpos en una diversidad de sistemas de expresión, la actividad de ADCC mejorada de anticuerpos producidos en células epiteliales mamarias de mamíferos tales como las células epiteliales mamarias de mamíferos de un animal transgénico tratado mediante ingeniería genética para segregar el anticuerpo en su leche, no ha sido previamente reconocida.

50

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado que anticuerpos producidos en células epiteliales mamarias de mamíferos tal como en las células epiteliales mamarias de mamíferos de un animal transgénico tratado mediante ingeniería genética para secretar anticuerpos en su leche, tienen una actividad de ADCC mejorada y una unión incrementada a CD16 en comparación con material derivado de cultivo de células. Estudios sobre la glicosilación de los anticuerpos derivados de la leche revelan menores contenidos en fucosa en los anticuerpos derivados de la leche. Por lo tanto, en esta memoria se proporcionan anticuerpos y composiciones de los mismos. Los anticuerpos proporcionados

60

son los producidos en células epiteliales mamarias de mamíferos. También se proporcionan métodos para producir los anticuerpos, así como métodos para su uso.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

5 Los anticuerpos con una actividad de ADCC mejorada se producen expresando los anticuerpos en células epiteliales mamarias de mamíferos. Las células epiteliales mamarias de mamífero son las de un mamífero no humano transgénico tratado mediante ingeniería genética para expresar anticuerpos en su leche.

10 Por lo tanto, en un aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende anticuerpos (o un anticuerpo) derivados de células epiteliales mamarias, en donde los anticuerpos tienen una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejorada. En otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende anticuerpos (o un anticuerpo) derivados de la leche, en donde los anticuerpos
15 derivados de la leche tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejorada. En una realización, la actividad ADCC de los anticuerpos es al menos el doble de alta que la actividad ADCC de anticuerpos derivados de un cultivo de células. En otra realización, la actividad ADCC de los anticuerpos es al menos tres veces, cuatro veces, cinco veces, siete veces o diez veces mayor que la actividad ADCC de anticuerpos derivados de cultivo de células. En una realización, la leche a partir de la cual se obtienen los anticuerpos derivados de la leche es la leche de un mamífero transgénico no humano tratado mediante ingeniería
20 genética para expresar el anticuerpo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la unión de la región Fc de anticuerpos IgG1 se mejora si el anticuerpo carece de la fucosa del núcleo que se encuentra fijada al sitio de glicosilación Asn297 en la región Fc (p. ej., una fucosa enlazada a la base de la estructura biantenaria). Los anticuerpos carecen en algunos aspectos de esta
25 fucosa del núcleo. Anticuerpos monoclonales producidos en la leche en otros aspectos son estructuras predominantemente con un alto contenido en manosa e híbridas. Generalmente, los anticuerpos se pueden unir más estrechamente al receptor FcRIII y pueden resultar en una ADCC mejorada.

De acuerdo con la invención, los anticuerpos han sido modificados para tengan un modelo de glicosilación según se proporciona en esta memoria y, como resultado de ello, tengan actividad ADCC mejorada. La modificación es el resultado de producir el anticuerpo de modo que sea expresado en células epiteliales mamarias de mamíferos según se proporciona en esta memoria.

Los anticuerpos de las composiciones proporcionados pueden ser homogéneos o heterogéneos con respecto a su
35 glicosilación.

En una realización, al menos una cadena de los anticuerpos ha sido modificada de modo que no contenga fucosa. En otra realización, una cadena de los anticuerpos ha sido modificada de modo que no contenga fucosa. Todavía en otra realización, la fucosa que no contiene al menos una cadena de los anticuerpos es 1,6-fucosa. En otra
40 realización, una o al menos una cadena de los anticuerpos ha sido modificada de modo que no contenga fucosa, pero los anticuerpos también han sido modificados para que contengan una oligomanosa o una oligomanosa adicional. La cadena que contiene la oligomanosa puede ser la misma cadena que no contiene fucosa, pero no es necesariamente así. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos ha sido modificada y luego expresada en células epiteliales mamarias de mamíferos. En una realización, la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos ha sido modificada. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos tales como anticuerpos anti-CD137, tiene una sustitución aminoácido de Asn297. En una realización adicional, la sustitución es con un aminoácido que no estará fucosilado. En otra realización, el Asn297 está sustituido por Gln.

En otra realización, los anticuerpos proporcionados han sido modificados de modo que contengan una oligomanosa o una oligomanosa adicional. En otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que al menos el 30% de los anticuerpos contenga al menos una oligomanosa. En otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los anticuerpos contenga al menos una oligomanosa. En una realización adicional, los anticuerpos han sido modificados de modo que menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de los anticuerpos no contengan fucosa en una o al menos en una
55 cadena. Todavía en una realización adicional, los anticuerpos han sido modificados de modo que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los anticuerpos contenga al menos una oligomanosa y menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de los anticuerpos contengan fucosa en una o en al menos una cadena.

En otra realización, los hidratos de carbono de los anticuerpos han sido modificados para que exhiban un modelo de glicosilación con alto contenido en manosa. Todavía en una realización adicional, los anticuerpos han sido modificados de modo que al menos una cadena de los anticuerpos contenga una oligomanosa y no esté fucosilada. Todavía en otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que el hidrato de carbono

principal de los anticuerpos no esté fucosilado. En una realización, el hidrato de carbono principal es una oligomanosa no fucosilada. En otra realización, el hidrato de carbono principal es una Man5 no fucosilada. Todavía en otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que menos del 40% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contenga fucosa. Todavía en otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que menos del 30%, 20%, 10% o menos de los hidratos de carbono de los anticuerpos contengan fucosa. En una realización, la fucosa es 1,6-fucosa. En otra realización, los anticuerpos han sido modificados de modo que al menos el 60% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean una oligomanosa no fucosilada, y menos del 40% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean con contenido en fucosa. En una realización adicional, los anticuerpos han sido modificados de modo que el 63% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean una oligomanosa no fucosilada, el 16% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean un G1F con contenido en fucosa del núcleo y el 21% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean un G2F con contenido en fucosa del núcleo.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos con actividad ADCC mejorada no están, de hecho, modificados por los medios proporcionados en esta memoria, sino que son anticuerpos seleccionados para los modelos de glicosilación anteriores.

En una realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En otra realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En una realización adicional, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos. En otra realización, los anticuerpos son anticuerpos de longitud completa. Todavía en otra realización, los anticuerpos son anticuerpos de cadena sencilla de longitud completa. Todavía en otra realización, los anticuerpos de longitud completa comprenden una cadena pesada y una cadena ligera. En una realización adicional, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos. Todavía en una realización adicional, los fragmentos de anticuerpos son parte de los polipéptidos de fusión Fc.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos son codificados por una construcción de ADN transgénico que comprende una región Fc que contiene oligosacáridos N-enlazados. De acuerdo con la invención, los anticuerpos se producen en la leche de un animal transgénico no humano. Todavía en otra realización, los anticuerpos tienen un modelo de glicosilación según se describe en esta memoria.

En una realización, los anticuerpos son del isotipo IgG, IgA o IgD. En una realización adicional, los anticuerpos son del isotipo G. En otra realización, los anticuerpos son del isotipo IgG1 o IgG2. En una realización adicional, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos. En otro aspecto de la invención, se proporcionan versiones humanizadas de los anticuerpos de la invención con características mejoradas (p. ej. características ADCC).

Los anticuerpos se pueden dirigir contra cualquier antígeno. En una realización, los anticuerpos se dirigen contra CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 o GPIIbIIIa. En otra realización, los anticuerpos se dirigen contra HM1.24, HLA-DR, MUC1, tenascina, PIGF, VEGF, un oncogen, un producto de oncogen, un antígeno de necrosis, antígeno 17-A1, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, gangliósido GD3 o TRAIL-R2. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos anti-CD137.

En cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en esta memoria, los anticuerpos son anticuerpos anti-CD137.

En una realización, las composiciones que comprenden los anticuerpos proporcionados pueden comprender, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, las composiciones proporcionadas pueden comprender, además, un agente terapéutico adicional. En una realización, el agente terapéutico adicional es un agente anti-cáncer o un agente inmunomodulador.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de una proteína transgénica de interés, un profármaco de la misma o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o de dicho profármaco y un vehículo, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones proporcionadas se pueden utilizar en un cierto número de métodos de tratamiento. Se describe un método para tratar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición proporcionada en esta memoria en una cantidad eficaz para mejorar la ADCC en el sujeto. Se describe otro método para tratar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición proporcionada en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad que el sujeto tenga o que tenga el riesgo de padecerla. En una realización, la enfermedad es cáncer. Indicaciones específicas contra las que los anticuerpos descritos en esta memoria podrían proporcionar efectos terapéuticos beneficiosos, en algunas realizaciones, incluyen el tratamiento de tumores sólidos; melanomas; así como carcinomas de mama, colon, ovarios, riñón, próstata y pulmón. Se

piensa, sin estar limitados, que el tratamiento podría ser eficaz debido a que los anticuerpos ayudarán a proporcionar un tratamiento inmunomodulador eficaz.

5 Dianas específicas pueden, por lo tanto, incluir también anticuerpos anti-CD3 (p. ej. linfoma no Hodgkin; enfermedad autoinmune - SLE), anticuerpos anti-CD16 (p. ej. FcRIII), anticuerpos anti-CD19 (p. ej. linfoma no Hodgkin), anti-CD20, anti-CD32B (p. ej. FcRIIB y alergia), anti-CD30 (p. ej. enfermedad de Hodgkin), anti-GPIIbIIIa (p. ej. trombosis), anti-TNF- α (p. ej. para artritis reumatoide y enfermedad de Crohn) anticuerpos anti-TEM para marcadores endoteliales de tumores (p. ej. para el control de la angiogénesis – anticáncer), etc.

10 En otra realización, la enfermedad es una enfermedad linfoproliferativa. En una realización adicional, la enfermedad es una enfermedad autoinmune. En otra realización de la invención, los anticuerpos con ADCC de la invención son eficaces en el tratamiento de encefalomiелitis derivada del sistema autoinmune, lupus eritematoso sistémico así como otros estados patológicos en los que anti-CD137 puede conferir algún beneficio.

15 En una realización, la cantidad del anticuerpo administrado al sujeto es de aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día.

20 En otra realización, al sujeto se le administra, además, un agente terapéutico adicional. En una realización, el agente terapéutico adicional es un agente anti-cáncer. En otra realización, el agente terapéutico adicional es un inmunomodulador. En una realización, el inmunomodulador es IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, un interferón, paclitaxel, TNF- α o una combinación de los mismos. En otra realización, al sujeto se le administra, además, IL-2. En otra realización, al sujeto se le administra, además, IL-12. En una realización adicional, al sujeto se le administra, además, un agente anti-cáncer y un inmunomodulador. En una realización, al sujeto se le administra, además, un inmunomodulador y trastuzumab. Todavía en otra realización, al sujeto se le administra, además, IL-21 y trastuzumab. En una realización, se utiliza un anticuerpo derivado de células epiteliales mamarias anti-CD137 en combinación con IL-21 y trastuzumab. En otra realización, el anticuerpo anti-CD137 es un anticuerpo con alto contenido en manosa que carece de fucosa en el núcleo. Por lo tanto, los anticuerpos, en algunas realizaciones se utilizan con un inmunomodulador que es eficaz en la contracción de tumores sólidos y en prevenir su recurrencia. En otras realizaciones, los anticuerpos se utilizan con otros agentes terapéuticos anti-cáncer tales como IL-21, IL-12 y/o trastuzumab.

35 El sujeto puede ser cualquier sujeto en el que se pueda desear una actividad de ADCC. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra o primate.

También se proporcionan métodos para producir anticuerpos con actividad de ADCC mejorada modificando los anticuerpos. Estos métodos comprenden modificar la glicosilación de los anticuerpos produciendo el anticuerpo en células epiteliales mamarias de mamíferos. En una realización, las células epiteliales mamarias de mamíferos son de un mamífero no humano tratado mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo en su leche. Todavía en otra realización, las células epiteliales mamarias de mamíferos son células epiteliales mamarias de mamíferos en cultivo.

45 Se describe un método para la producción de un anticuerpo transgénico y variantes y fragmentos del mismo, comprendiendo el método expresar en la leche de un mamífero no humano transgénico un anticuerpo transgénico codificado por una construcción de ácido nucleico. En una realización, el método para producir los anticuerpos de la invención comprende:

- (a) transfectar células de mamífero no humanas con una construcción de ADN de transgen que codifica un anticuerpo transgénico deseado;
- (b) seleccionar células en las que dicha construcción de ADN de transgen ha sido insertada en el genoma de las células; y
- (c) realizar un primer proceso de transferencia nuclear para generar un mamífero transgénico no humano heterocigótico para el anticuerpo transgénico deseado y que pueda expresarlo en su leche.

55 En otra realización, el método comprende:

- (a) proporcionar un mamífero transgénico no humano tratado mediante ingeniería genética para expresar un anticuerpo,
- (b) expresar el anticuerpo en la leche del mamífero transgénico no humano; y
- (c) aislar los anticuerpos expresados en la leche.

60 En otras realizaciones, los métodos comprenden, además, etapas para inducir la lactancia y/o etapas para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos obtenidos. Todavía en otras realizaciones, los métodos

comprenden, además, etapas de aislamiento y/o purificación adicionales. Todavía en otras realizaciones, los métodos comprenden, además, etapas para comparar la actividad ADCC de los anticuerpos obtenidos con anticuerpos producidos en cultivo de células. En realizaciones adicionales, los métodos comprenden, además, etapas para comparar la actividad de ADCC de los anticuerpos obtenidos con anticuerpos producidos por células epiteliales no mamarias. Células de este tipo pueden ser células de un cultivo de células.

Los anticuerpos se pueden obtener, en algunas realizaciones, recogiendo los anticuerpos de la leche de un animal transgénico producido según se proporciona en esta memoria o de una cría de dicho animal transgénico.

En algunas realizaciones, la construcción que codifica el anticuerpo (o polipéptido de fusión del anticuerpo deseado) es impulsada por al menos un promotor de beta-caseína. En otras realizaciones, el mamífero transgénico no humano es un ungulado. Todavía en otras realizaciones, el mamífero transgénico no humano es una cabra.

En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos por el mamífero transgénico se producen a un nivel de al menos 1 gramo por litro de leche producida.

En otro aspecto, se proporciona un método para potenciar la actividad ADCC de un anticuerpo, que comprende modificar la glicosilación del anticuerpo por los métodos proporcionados en esta memoria. En una realización, el anticuerpo se modifica de manera que al menos una cadena del anticuerpo no contenga fucosa. En otra realización, el anticuerpo se modifica de manera que una cadena del anticuerpo no contenga fucosa. Todavía en otra realización, el anticuerpo se modifica de modo que contenga una oligomanosa o una oligomanosa adicional. Todavía en otra realización, el anticuerpo se modifica de modo que contenga una oligomanosa o una oligomanosa adicional.

Todavía en otra realización, los anticuerpos se modifican de modo que los hidratos de carbono de los anticuerpos exhiban un modelo de glicosilación con alto contenido en manosa. En una realización, los anticuerpos se modifican de manera que al menos una cadena en los anticuerpos contenga oligomanosa y no esté fucosilada. En otra realización, los anticuerpos se modifican de modo que una cadena de los anticuerpos contenga oligomanosa y no esté fucosilada. En una realización adicional, los anticuerpos se modifican de modo que el hidrato de carbono principal de los anticuerpos no esté fucosilado. En una realización, el hidrato de carbono principal es una oligomanosa no fucosilada. En otra realización, el hidrato de carbono principal es una Man5 no fucosilada. Todavía en una realización adicional, los anticuerpos se modifican de modo que menos del 40% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contenga fucosa. En una realización, los anticuerpos se modifican de manera que menos del 30%, 20%, 10% o menos de los hidratos de carbono de los anticuerpos contenga fucosa. Todavía en una realización adicional, los anticuerpos se modifican de manera que al menos el 30% de los anticuerpos tenga al menos una oligomanosa. En una realización los anticuerpos se modifican de modo que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los anticuerpos tengan al menos una oligomanosa. Todavía en una realización adicional, los anticuerpos se modifican de manera que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los anticuerpos contengan al menos una oligomanosa y menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de los anticuerpos contenga fucosa en una o al menos en una cadena. En otra realización, los anticuerpos se modifican de modo que al menos el 60% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sean una oligomanosa no fucosilada y menos del 40% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contengan fucosa. En una realización adicional, los anticuerpos se modifican de modo que el 63% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sea una oligomanosa no fucosilada, el 16% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sea un G1F con contenido en fucosa en el núcleo y el 21% de los hidratos de carbono de los anticuerpos sea un G2F con contenido en fucosa en el núcleo.

En un aspecto adicional más, se proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende recoger el anticuerpo de la leche de un mamífero no humano transgénico tratado mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo en su leche, y determinar la actividad de ADCC del anticuerpo. En una realización, el método comprende, además, comparar la actividad de ADCC del anticuerpo recogido con la actividad de ADCC del anticuerpo expresado en el cultivo de células. En otra realización, el mamífero no humano transgénico es una cabra, oveja, bisonte, camello, vaca, cerdo, conejo, búfalo, caballo, rata, ratón o llama.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende recoger el anticuerpo de células epiteliales mamarias tratadas mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo, y determinar la actividad de ADCC del anticuerpo. En una realización, el método comprende, además, comparar la actividad de ADCC del anticuerpo recogido con la actividad de ADCC del anticuerpo expresado en células epiteliales no mamarias.

En un aspecto adicional más, se proporciona un método que comprende obtener anticuerpos como en los métodos proporcionados en esta memoria y comparar la actividad de ADCC de los anticuerpos con otro conjunto de

anticuerpos. En una realización, el otro conjunto de anticuerpos son anticuerpos obtenidos del cultivo de células. En otra realización, el otro conjunto de anticuerpos son anticuerpos obtenidos de células epiteliales no mamarias en cultivo. En una realización adicional, el otro conjunto de anticuerpos son anticuerpos obtenidos de células epiteliales mamarias en cultivo. Todavía en una realización adicional, el otro conjunto de anticuerpos son anticuerpos obtenidos de fluido corporal o tejido. Todavía en una realización adicional, el otro conjunto de anticuerpos son anticuerpos obtenidos de la leche de un mamífero. En una realización, el mamífero es un mamífero transgénico no humano tratado mediante ingeniería genética para expresar el otro conjunto de anticuerpos en su leche.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Fig. 1** proporciona espectros MALDI-TOF de oligosacáridos N-enlazados de anticuerpo anti-CD137 glicosilado. Los glicanos fueron liberados mediante PNGasa F. La **Fig. 1A** proporciona un espectro para el anticuerpo derivado de la leche de ratón; la **Fig. 1B** proporciona un espectro para el anticuerpo derivado de cultivo de células; la **Fig. 1C** proporciona un espectro para el anticuerpo derivado de la leche de cabra.

La **Fig. 2** proporciona una comparación de mapas de oligosacáridos obtenidos mediante HPLC con detección por fluorescencia (marcados 2-AA) de oligosacáridos liberados a partir de anticuerpos glicosilados. La **Fig. 2A** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado de la leche de ratón; la **Fig. 2B** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado de la leche de ratón tratado con Endo H; la **Fig. 2C** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado del cultivo de células; la **Fig. 2D** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado del cultivo de células tratado con Endo H; la **Fig. 2E** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado de leche de cabra; la **Fig. 2F** proporciona una comparación con un anticuerpo derivado de leche de cabra tratado con Endo H.

La **Fig. 3** ilustra la sensibilidad Endo H de oligosacáridos principales liberados a partir de un anticuerpo anti-CD137 derivado de leche de ratón. La muestra de la **Fig. 2** se trató durante una noche con Endo H. La **Fig. 3A** proporciona los resultados para el anticuerpo derivado de la leche de ratón; la **Fig. 3B** proporciona los resultados para el anticuerpo derivado de la leche de ratón tratado con Endo H; la **Fig. 3C** proporciona los resultados para el anticuerpo derivado del cultivo de células; la **Fig. 3D** proporciona los resultados para el anticuerpo derivado del cultivo de células tratado con Endo H.

La **Fig. 4** muestra la unión de concanavalina A (Con A) de anticuerpos. El anticuerpo purificado con proteína A se cargó en una columna de Con A y se eluyó con tampón con contenido en alfa-metil-manosidasa. Las fracciones se vigilaron en cuanto a la absorbancia a 280 nm. La **Fig. 4A** muestra los resultados para el anticuerpo anti-CD137 glicosilado en una columna Con A; la **Fig. 4B** muestra los resultados para un anticuerpo anti-CD137 no glicosilado en una columna Con A.

La **Fig. 5** demuestra la unión de anticuerpos a células 786-O. La unión de cada uno de los anticuerpos se midió mediante análisis FACS y se recubrió sobre un anticuerpo testigo negativo (anti-2,4-dinitrofenol (DNP)) y anti-HER2. La **Fig. 5A** muestra los resultados con un anticuerpo aglicosilado derivado de la leche de ratón; la **Fig. 5B** muestra los resultados con un anticuerpo glicosilado derivado de la leche de ratón; la **Fig. 5C** muestra los resultados con un anticuerpo glicosilado derivado de cultivo de células. La **Fig. 5D** muestra los resultados con un anticuerpo glicosilado derivado de leche de cabra.

La **Fig. 6** ilustra el exterminio potenciado de células 786-O por parte de un anticuerpo derivado de leche en un ensayo de ADCC. Cuadrados: derivado de leche de ratón; triángulos invertidos: derivado de cabra; rombos: derivado de cultivo de células; círculos: derivado de leche de ratón aglicosilada; cuadrados en blanco: trastazumab; triángulos: anticuerpo anti-DNP.

La **Fig. 7** proporciona un esquema general de las construcciones transgénicas para la expresión de anticuerpos en la leche. El gen de interés reemplaza a la región codificadora de beta-caseína caprina, un gen específico para la leche. La región del promotor de 6,2 kb está enlazada a las regiones codificadoras de las cadenas H o L de IgG, seguida de secuencias 3' de beta-caseína caprina no traducidas y elementos situados más abajo. Recuadros en negro: exones H y L; recuadros rayados: intrones genómicos; flechas: dirección de la transcripción.

La **Fig. 8** proporciona una disgregación de los hidratos de carbono presentes o ausentes en anticuerpos producidos por animales transgénicos.

La **Fig. 9** proporciona un esquema general para un ejemplo de un método de producción.

La **Fig. 10** ilustra un modelo de relleno del espacio de un anticuerpo que muestra la localización física de fucosa en

el núcleo.

La **Fig. 11** demuestra la unión de anticuerpos a células CHO que expresan CD137. La **Fig. 11A** proporciona los resultados para células CHO sin CD137 (testigo negativo); la **Fig. 11B** proporciona los resultados para células CHO que expresan CD137. La curva con trazo oscuro en cada gráfica es para la tinción con un anticuerpo anti-DNP irrelevante.

La **Fig. 12** ilustra el exterminio potenciado de células CHO que expresan CD137 por parte de un anticuerpo derivado de la leche en un ensayo de ADCC.

La **Fig. 13** proporciona resultados de un análisis de biosensor de la unión IgG1-sFcgRIIIa. La **Fig. 13a** muestra los resultados con el anticuerpo de leche de cabra; la **Fig. 13B** muestra los resultados con el anticuerpo de leche de ratón; la **Fig. 13C** muestra los resultados con el anticuerpo del cultivo de células; la **Fig. 13D** muestra los resultados con anticuerpo aglicosilado de leche de ratón.

La **Fig. 14** ilustra un kit que comprende un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se ha descubierto que anticuerpos producidos en la leche de animales transgénicos tienen una actividad de ADCC mejorada en relación con anticuerpos recombinantes producidos a través del cultivo de células *in vitro*. El modelo de glicosilación de anticuerpos que tienen actividad de ADCC mejorada también ha sido evaluado. Se proporcionan composiciones de anticuerpos producidos en células epiteliales mamarias al igual que los métodos de su producción y uso.

En un aspecto de la invención, los anticuerpos tienen actividad de ADCC mejorada. Tal como se utiliza en esta memoria, "actividad de ADCC mejorada" pretende referirse a un anticuerpo o composición del mismo que exhibe una mayor actividad de ADCC cuando se produce por un método que altera su modelo de glicosilación que cuando se produce por un método que no altera su modelo de glicosilación o el nivel de actividad de ADCC que posee antes de la alteración de su modelo de glicosilación según se proporciona en esta memoria. Anticuerpos con actividad de ADCC mejorada incluyen aquellos que antes de la alteración no exhibían actividad de ADCC alguna. Tal como se utiliza en esta memoria, "modelo de glicosilación" se refiere al conjunto de hidratos de carbono que están presentes en un anticuerpo individual o en un grupo de anticuerpos. Se pueden realizar cambios al modelo de glicosilación alterando la glicosilación de un anticuerpo o de un grupo de anticuerpos. El cambio del modelo de glicosilación de una composición de anticuerpos pretende abarcar casos en los que ha cambiado la glicosilación de un anticuerpo individual, un subconjunto de los anticuerpos en las composiciones o la totalidad de los anticuerpos en la composición. El modelo de glicosilación se puede determinar por muchos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, métodos para analizar hidratos de carbono en proteínas han sido descritos en la solicitudes de patente de EE.UU. publicadas como US 2006-0057638 y US 2006-0127950.

La glicosilación es importante para el plegamiento correcto, la fijación de objetivos, la bioactividad y el aclaramiento de glicoproteínas terapéuticas. Con el desarrollo, por ejemplo, de animales transgénicos como sistemas de expresión, se ha apreciado que diferentes fondos genéticos resultan en diferentes niveles de expresión y glicosilación de las proteínas producidas. La glicosilación de proteínas transgénicamente derivadas aisladas de la leche de cabra es diferente a la de proteínas recogidas de un cultivo de células (Denman et al., 1991). En antitrombina humana producida transgénicamente, el tipo de glicosilación es dependiente del sitio. Oligosacáridos fucosilados y sialilados se encontraron en las posiciones Asn96 y Asn192, mientras que Asn155 tenía un oligosacárido oligomanosa (Edmunds et al., 1998). La glicosilación dependiente del sitio también se encontró en interferón gamma producido en la leche de ratón (James et al., 1995).

La glicosilación es una modificación post-traducción que puede producir una diversidad de formas de proteínas finales en el estado natural. Moléculas de IgG se glicosilan en el residuo Asn₂₉₇ del dominio CH2, dentro de la región Fc. Determinadas alteraciones en la estructura de los hidratos de carbono también pueden afectar a la función del anticuerpo o a la eficacia terapéutica. Por ejemplo, en enfermedades tales como artritis reumatoide se ha documentado una incidencia mayor que la normal de estructuras agalactosilo (que parecen ser específicas para un hidrato de carbono asociado a Fc de IgG) (Parekh et al., 1985; Rademacher et al. 1988a). Se ha propuesto que esta estructura aglicosilada es más móvil que la estructura observada normalmente en esta región y, así, puede inducir cambios en la estructura cuaternaria de la glicoproteína, contribuir a la inmunogenicidad del anticuerpo o puede por sí misma contribuir a una función aberrante del anticuerpo (Rademacher et al. 1988b; Axford et al. 1992). Sin embargo, en este estado patológico, esta estructura sólo es una de numerosas glicoformas observadas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en esta memoria tienen una actividad de ADCC al

menos dos veces superior a la actividad de ADCC de anticuerpos derivados del cultivo de células epiteliales no mamarias. En otras realizaciones, la glicosilación de los anticuerpos es modificada por los métodos proporcionados, y la actividad de ADCC de los anticuerpos modificados es al menos dos veces superior a la actividad de ADCC de la versión no modificada del mismo anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos tienen al menos una actividad de ADCC 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 30 veces superior. Los anticuerpos proporcionados se obtienen a partir de la expresión en células epiteliales mamarias de mamíferos. A anticuerpos de este tipo también se les alude en esta memoria como anticuerpos derivados de células epiteliales mamarias. En algunas realizaciones, los anticuerpos se obtienen de la expresión en la leche de un animal transgénico no humano. A anticuerpos de este tipo se les alude también en esta memoria como “anticuerpos derivados de la leche”. Tal como se utiliza en esta memoria, “transgénica” se refiere a una célula que incluye una molécula de ácido nucleico que ha sido insertada artificialmente en una célula o en un antecesor de la misma, y se convierte en parte del genoma del animal que se desarrolla a partir de esa célula. El término se utiliza también con referencia a un animal que ha tenido una molécula de ácido nucleico que ha sido insertada artificialmente en sus células o genoma.

Generalmente, en algunas realizaciones, la glicosilación exhibe un modelo de glicosilación con elevado contenido en manosa. Tal como se utiliza en esta memoria, un “modelo de glicosilación con alto contenido en manosa” pretende aludir a un anticuerpo que contiene al menos una oligomanosa o una composición de anticuerpos en donde al menos el 30% de los anticuerpos contiene al menos una oligomanosa. En algunas realizaciones, al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los hidratos de carbono de los anticuerpos son oligomanosa. En algunas realizaciones, al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de los hidratos de carbono de los anticuerpos son oligomanosa no fucosilada. En otras realizaciones, menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de los hidratos de carbono de los anticuerpos contienen fucosa. Todavía en otras realizaciones, los anticuerpos son de bajo contenido en fucosa y de alto contenido en oligomanosa. Por lo tanto, en realizaciones adicionales, al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más de los hidratos de carbono de los anticuerpos son oligomanosa y menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contienen fucosa. Por lo tanto, todavía en una realización adicional, al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más de los hidratos de carbono de los anticuerpos son oligomanosa no fucosilada y menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contienen fucosa. Una realización de la invención pertenece a anticuerpos con actividad de ADCC incrementada que no tienen un azúcar 1,6-fucosa en la cadena pesada. En una realización, la unión de la región Fc de los anticuerpos al receptor FcγRIII encontrado en monocitos, macrófagos y células asesinas naturales es potenciada si el anticuerpo carece de la fucosa en el núcleo que se encuentra fijada al sitio de glicosilación Asn297 en la región Fc (p. ej. una fucosa enlazada a la base de la estructura biantenaria).

Otros anticuerpos con modelos de glicosilación específicos se describen en esta memoria en los **Ejemplos**. Tal como se utiliza en esta memoria, cuando se comentan composiciones de anticuerpos, las composiciones pueden ser homogéneas o heterogéneas en la glicosilación.

Los anticuerpos se pueden seleccionar en cuanto a su capacidad de unirse a receptores u otras proteínas tales como las implicadas en un proceso patológico y/o de ADCC. Los anticuerpos se pueden dirigir a cualquier marcador celular en el que la provisión de un anticuerpo dirigido al mismo y que tenga actividad de ADCC proporcionaría un beneficio terapéutico. Los anticuerpos incluyen los que pueden unir antígenos diana tales como marcadores de células tumorales. Ejemplos de marcadores de células y enfermedades a título de ejemplo contemplados en esta memoria incluyen CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD32B, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD59, CD74, CD80, CD126, CD138, CD137 o GPIIbIIIa. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden dirigir contra HM1.24, HLA-DR, MUC1, tenascina, PIGF, VEGF, un oncogen, un producto de oncogen, un antígeno de necrosis, antígeno 17-A1, IL-2, T101, TAC, IL-6, TRAIL-R1, gangliósido GD3 o TRAIL-R2. Otras dianas incluyen: anticuerpos anti-CD3 (p. ej. linfoma no Hodgkin; enfermedad autoinmune - SLE), anticuerpos anti-CD16 (p. ej. FcRIII), anticuerpos anti-CD19 (p. ej. linfoma no Hodgkin), anti-CD20, anti-CD32B (p. ej. FcRIIB y alergia), anticuerpos anti-CD30 (p. ej. enfermedad de Hodgkin), anti-GPIIbIIIa (p. ej. trombosis), anti-TNF-α (p. ej. artritis reumatoide y enfermedad de Crohn), anticuerpos anti-TEM para marcadores endoteliales de tumores (p. ej. para el control de la angiogénesis – anticáncer). Una vez unidos a marcadores de células tumorales, los anticuerpos de la invención pueden reclutar monocitos, macrófagos y células asesinas naturales para atacar a las células tumorales. Por lo tanto, los anticuerpos con ADCC mejorada pueden considerarse inmunomoduladores que pueden ser eficaces en la contracción de tumores sólidos y en la prevención de su recurrencia.

Amplios estudios demostraron que la estimulación de CD137 por parte de su ligando natural o por parte de anticuerpos agonistas potenciaba una respuesta anti-tumor que resultaba en la regresión de tumores en ratón establecidos en diversos modelos. CD137 (también denominada 4-1BB) es una glicoproteína de la membrana que se expresa en varios tipos de células linfoides. Se ha informado que un anticuerpo monoclonal agonista contra

CD137 murino contrae los tumores en ratones *in vivo* y previene su recurrencia. La estimulación de CD137 a través de su ligando natural o anticuerpos agonistas potencia la respuesta inmune antitumoral *in vivo* a través de la estimulación de células T efectoras reactivas de tumores y la actividad NK reguladora mejorada. La administración sistémica de los anticuerpos monoclonales anti-CD137 murino inducían una regresión completa de tumores grandes en ratones tales como el sarcoma AGF104A deficientemente inmunogénico y el mastocitoma P815 altamente tumorigénico, así como timoma EL4, melanoma K1735, sarcoma B10.2 y 87, carcinoma renal RENCA, plasmacitoma J558, sarcoma MCA205, cáncer de mama JC, cáncer de colon MCA26 y glioma GL261, solos o en combinación con otras modalidades terapéuticas.

El anticuerpo anti-CD137 en una realización de la invención puede ser clonado y expresado en la leche de varias líneas de ratones y cabras transgénicos en forma de un "mini-gen" genómico. La expresión de este gen se encuentra bajo el control de los elementos reguladores de β -caseína en cabras. Se ha establecido una expresión sustancial de las variantes de anticuerpos tanto en ratones como en cabras. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD137 con actividad ADCC mejorada y, por lo tanto, propiedades terapéuticas mejoradas. De acuerdo con la presente invención y utilizando el anticuerpo anti-CD137 producido por animales transgénicos como un ejemplar de la invención, se desarrolló un anti-CD137 agonista de anticuerpo monoclonal quimérico no humano:humano (es decir, ratón:ser humano). Se espera que la humanización del anticuerpo anti-CD137 potencie su uso para pacientes que están siendo sometidos a inmunoterapia o para otras indicaciones. Sobre la base de la identidad de la secuencia de aminoácidos observada, regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las regiones VL y VH se injertaron en el clon de inmunoglobulina de idiotipo asociado anti-ADN humana. Se observó, mediante ELISA competitivo, que un anticuerpo quimérico recombinante de la invención exhibía un perfil de bioactividad similar cuando se comparaba con el anticuerpo monoclonal murino. El anticuerpo anti-CD137 era eficaz para mediar tanto en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos como en la citotoxicidad mediada por el complemento cuando se somete a ensayo. Se espera que la humanización de las secuencias de anticuerpos eliminen cualquier respuesta del anticuerpo anti-ratón humano no deseada, permitiendo una administración i.v. repetida en seres humanos.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas mediante enlaces disulfuro, es decir, heterotetrámeros covalentes constituidos por dos cadenas H de Ig idénticas y dos cadenas L idénticas que son codificadas por genes diferentes. Cada una de las cadenas pesadas está constituida por una región variable de la cadena pesada (abreviada en esta memoria HCVR o V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está constituida por tres dominios C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada una de las cadenas ligeras está constituida por una región variable de la cadena ligera (abreviado en esta memoria con LCVR o V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está constituida por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones del marco (FR). Cada una de V_H y V_L está constituida por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluidas diversas células del sistema inmune (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. La formación de una molécula de anticuerpo funcional madura se puede conseguir cuando dos proteínas son expresadas en cantidades estequiométricas y se auto-ensamblan con la configuración apropiada.

El término "anticuerpos" pretende abarcar fragmentos de unión a antígenos de los mismos. Tal como se utiliza en esta memoria, un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígenos de un anticuerpo se puede realizar por parte de fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H son codificados por genes separados, éstos se pueden unir utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite producirlos como una cadena de proteínas sencilla en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, p. ej., Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Anticuerpos de cadena sencilla de este tipo también pretenden quedar abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de

un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando procesos convencionales tales como procesos de fragmentación proteolítica, según se describe en J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs., 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), así como por otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los fragmentos se rastrean en cuanto a su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

5 Fragmentos de unión a antígenos preferidos incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv de CDR3. En una realización, el fragmento de anticuerpo es parte de un polipéptido de fusión Fc. Como un ejemplo, el fragmento de anticuerpos es una región Fc que contiene oligosacáridos N-enlazados.

10 Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en esta memoria, pretende aludir a un anticuerpo que está esencialmente exento de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo isoforma o variante de un antígeno puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, p. ej. procedentes de otras especies. Además de ello, un anticuerpo aislado puede estar esencialmente exento de otro material celular y/o de otros productos químicos. Tal como se
15 utiliza en esta memoria, "unión específica" se refiere a una unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad que al menos dos veces mayor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Por lo tanto, los anticuerpos proporcionados en esta memoria en algunas realizaciones se unen específicamente a un antígeno diana.

20 Los anticuerpos son del isotipo IgG. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o tiene un dominio constante y/o variable de inmunoglobulina de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos. Todavía en otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos recombinantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos
25 monoclonales, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos o una mezcla de estos. En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico es una fusión, tratada mediante ingeniería genética, de partes de un anticuerpo no humano (p. ej. ratón, rata, conejo) con partes de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos, en algunas realizaciones, pueden contener aproximadamente 33% de proteína no humana y 67% de proteína humana. Con relación específica a componentes quiméricos en ratón, éstos pueden desarrollarse para reducir la respuesta HAMA provocada por anticuerpos murinos, ya que pueden combinar la especificidad del anticuerpo murino con la interacción del sistema inmune humano eficaz de un anticuerpo humano.

30 En otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos recombinantes. La expresión "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes tales como anticuerpos aislados de un animal que es transgénico para genes de inmunoglobulina de otras especies, anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante
35 transfectado en una célula hospedante, anticuerpos aislados de un banco de anticuerpos combinatorio y recombinante o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que implican el corte y empalme de secuencia de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

40 Todavía en otras realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que combina las regiones variable o hipervariables murinas con la región constante humana o las regiones de marco constante y variable. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que conserva
45 sólo las CDRs de unión a antígenos procedentes del anticuerpo parental en asociación con regiones de marco humanas (véase Waldmann, 1991, *Science*, 252:1657). Se espera que anticuerpos quiméricos o humanizados de este tipo que conservan la especificidad de unión del anticuerpo murino tengan una inmunogenicidad reducida cuando se administran *in vivo* para aplicaciones de diagnóstico, profilácticas o terapéuticas de acuerdo con la invención.

50 En otra realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado con actividad de ADCC aumentada. En una realización, este anticuerpo es CD137. La humanización (también denominada re-configuración o injerto de CDR) es una técnica establecida para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales procedentes de fuentes xenogénicas tales como ratones. Anticuerpos humanizados se pueden generar a través de técnicas de
55 biología molecular convencionales. En una realización, ésta comprende el injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de roedores en un marco humano. Sin embargo, esta técnica es generalmente un proceso iterativo y entran en juego un cierto número de elementos cuando se diseña un anticuerpo humanizado: la longitud de las CDRs, los marcos humanos y la sustitución de residuos procedentes del anticuerpo monoclonal (mAb) de roedores en las regiones de marco humanas (retro-mutaciones).

60 Los mAbs de ratón terapéuticos son a veces no ideales para el uso humano, debido a que la respuesta HAMA (anticuerpos anti-ratón humanos) neutraliza el anticuerpo y les separa rápidamente de la circulación y, en el peor

de los casos, induce una hipersensibilidad alérgica grave. Se han desarrollado varias estrategias para reemplazar a la mayoría de las secuencias Ig murinas por secuencias humanas, dando como resultado menores efectos secundarios al tiempo que conservan su eficacia. Una estrategia para desarrollar un mAb terapéutico humano consiste en reemplazar las regiones constantes de la cadena pesada (H) y de la cadena ligera (L) murinas (C_H y C_L, respectivamente) o cadenas genéricamente no humanas por regiones humanas de modo que el anticuerpo quimérico resultante esté constituido generalmente por secuencias de proteína IgG humana, excepto los dominios de unión a antígenos que permanecerían siendo no humanos. Esta estrategia se utilizó para el desarrollo de Rituxan® (Rituximab CD20 anti-humano, Genentech), el primer anticuerpo monoclonal aprobado en los Estados Unidos de América utilizado para tratar el linfoma no Hodgkin. En algunas estimaciones, al proporcionar mAbs terapéuticos con secuencias C_H y C_L humanas se debería eliminar aproximadamente el 90% de la inmunogenicidad de proteínas de anticuerpos murinos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti CD137 monoclonal quimérico no humano:humano (es decir, ratón:ser humano). Regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las regiones V_L y V_H del anticuerpo de ratón se injertaron en el clon de inmunoglobulina de idiotipo asociado a anti-ADN humano. Mediante ELISA competitivo, el anticuerpo quimérico recombinante de la invención exhibía un perfil de bioactividad similar cuando se comparaba con el anticuerpo monoclonal murino. El anticuerpo anti-CD137 era eficaz en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y en la citotoxicidad mediada por el complemento.

De acuerdo con una realización alternativa, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden modificar de modo que estén en forma de un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico. La expresión "anticuerpo biespecífico" pretende incluir cualquier agente, p. ej. una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos que tenga dos especificidades de unión diferentes que se unan a, o interactúen con (a) un antígeno de la superficie de la célula y (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora. La expresión "anticuerpo multiespecífico" pretende incluir cualquier agente, p. ej. una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos que tenga más de dos especificidades de unión diferentes que se unan a, o interactúen con (a) un antígeno de la superficie de la célula, (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, la invención incluye, pero no se limita a anticuerpos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos y otros multiespecíficos que están dirigidos a antígenos de la superficie de la célula y a receptores Fc en células efectoras. La expresión "anticuerpos biespecíficos" incluye, además, diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos, en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena de polipéptidos, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando con ello a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígenos (véase, p. ej., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poijak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria pretende incluir anticuerpos que tengan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej. mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica para el sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos tales como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias de marco humanas (a las que se alude en esta memoria como "anticuerpos humanizados"). Anticuerpos humanos se generan utilizando ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmune humano más que del sistema de ratón.

Anticuerpos monoclonales totalmente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse p. ej. las patentes de EE. UU. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 y referencias citadas en ellas. Estos animales han sido genéticamente modificados, de modo que existe una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej. murinos). Los animales son modificados adicionalmente para que contengan la totalidad o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana de manera que la inmunización de estos animales resulte en la producción de anticuerpos totalmente humanos del antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (p. ej. XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), anticuerpos monoclonales se preparan de acuerdo con la tecnología del hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tienen secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA – siglas en inglés) cuando se administran a seres humanos. Los anticuerpos humanos, al igual que cualquiera de los anticuerpos proporcionados en esta memoria, pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

5 Son bien conocidos procesos para producir anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos se producen administrando por vía subcutánea un antígeno a conejos blancos de Nueva Zelanda que han sido primeramente sangrados para obtener suero pre-inmune. El antígeno se puede inyectar a un volumen total de 100 μ l por cada sitio en seis sitios diferentes, típicamente con uno o más ajustes. Después, los conejos son sangrados dos semanas después de la primera inyección y son periódicamente reforzados con el mismo antígeno tres veces cada seis semanas. 10 días después de cada refuerzo se recoge una muestra de suero. Anticuerpos policlonales se recuperan del suero, preferiblemente mediante cromatografía de afinidad, utilizando antígeno para capturar al anticuerpo. Este y otros procesos para la producción de anticuerpos policlonales se describen en E. Harlow, et al., compiladores, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

15 Para producir anticuerpos monoclonales, los ratones son inyectados múltiples veces (véase antes), los bazo de los ratones se retiran y se resuspenden en una solución salina tamponada con fosfato (PBS – siglas en inglés). Las células del bazo sirven como una fuente de linfocitos, algunos de los cuales están produciendo anticuerpo de la especificidad apropiada. Estos son luego fusionados con una célula acompañante de mieloma en permanente crecimiento, y los productos de la fusión se extienden en placa en un cierto número de pocillos de cultivo tisular en presencia de un agente selectivo tal como HAT. Después, los pocillos son rastreados para identificar aquellos que 20 contengan células que producen un anticuerpo útil mediante ELISA. Estas son luego extendidas de nuevo en placas. Después de un período de crecimiento, estos pocillos son de nuevo rastreados para identificar células productoras de anticuerpos. Se llevan a cabo varios procesos de clonación hasta que más del 90% de los pocillos contengan clones sencillos que sean positivos para la producción de anticuerpos. A partir de este proceso se establece una línea estable de clones que producen el anticuerpo. El anticuerpo monoclonal se puede luego purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A Sepharose, cromatografía de intercambio de iones así como variaciones y combinaciones de estas técnicas (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 6.998.467).

Una estrategia alternativa para desarrollar un producto de mAb consiste en producir el anticuerpo en ratones transgénicos en los que todo el repertorio de Ig nativo ha sido reemplazado por genes Ig humanos. Ratones de este tipo producen proteínas de anticuerpos totalmente humanas. De este modo, se produce un anticuerpo quimérico, humanizado o totalmente humano, ambas realizaciones de la presente invención. Los dos anticuerpos tendrán una función efectora y son útiles en el tratamiento del cáncer y de lesiones cancerígenas. La realización de anticuerpo quimérico de la presente invención conserva las secuencias variables murinas originales (de unión a antígeno) y, por lo tanto, deberían conservar sus propiedades de unión y funcionales.

35 El anticuerpo puede tener un modelo de glicosilación según se proporciona en cualquier parte en esta memoria, que proporciona o mejora la actividad de ADCC del anticuerpo. La invención abarca todos los métodos de generar anticuerpos con actividad de ADCC aumentada según se proporciona en esta memoria. En una realización, los métodos comprenden generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos. En otra realización, los métodos comprenden el uso de ratones transgénicos o de otro sujeto animal no humano que tienen sus genes de anticuerpos reemplazados por genes humanos y que producen anticuerpos “humanizados” en respuesta a la inmunización con un antígeno de interés. Todavía en otra realización, se pueden utilizar despliegues en fagos para tratar mediante ingeniería bacteriófagos de modo que exhiban un anticuerpo monoclonal totalmente humano sobre su superficie. Anticuerpos generados por cualquiera de los métodos anteriores pueden utilizarse para generar animales transgénicos. En una realización, esto se realiza integrando una construcción de ADN que codifica el anticuerpo en el genoma del animal transgénico.

La leche producida en animales transgénicos, incluidos ratones y cabras, puede comprender grandes cantidades de anticuerpo con contenido en oligomanosa. Estos anticuerpos con contenido en oligomanosa tienen un perfil de ADCC mejorado y funcionan como una diana preferida para receptores diana de monocitos, macrófagos y células asesinas naturales. Se proporcionan métodos para producir de manera recombinante los anticuerpos descritos en esta memoria, de modo que éstos se produzcan en células epiteliales mamarias de mamíferos. Esto se puede conseguir en un cultivo de células. Esto también se puede conseguir a través de la expresión de los anticuerpos en la leche de animales transgénicos.

55 En una realización, las células epiteliales mamarias de mamíferos han sido tratadas mediante ingeniería para expresar el anticuerpo en la leche del animal transgénico tal como un ratón o cabra. La expresión de este gen, por ejemplo, se encuentra bajo el control de los elementos reguladores de β -caseína en cabras. Se ha establecido la expresión sustancial de los anticuerpos tanto en ratones como en cabras. Los animales transgénicos se pueden generar co-transfectando construcciones separadas que contienen las cadenas H y L, o una construcción que contiene ambas cadenas. En determinadas realizaciones, los dos transgenes se integran en el mismo sitio del cromosoma, de modo que los genes se transmiten juntos a la progenie y la expresión de las proteínas se regula

60

conjuntamente. En algunas realizaciones, la expresión se optimiza para células epiteliales del conducto mamario individuales que producen proteínas de la leche. Los animales pueden ser, por ejemplo, animales productores de leche tales como cabras y ganado, o ratones.

5 Por ejemplo, para producir líneas de células primarias que contienen una construcción (p. ej. que codifican un CD137 anti-humano quimérico) para uso en la producción de cabras transgénicas mediante transferencia nuclear, las construcciones de cadena pesada y ligera se pueden transfectar en células epiteliales de la piel de cabra primarias, que se expanden clonalmente y que se caracterizan por completo para evaluar el número de copias de transgenes, la integridad estructural del transgen y el sitio de integración en el cromosoma. Tal como se utiliza en esta memoria, “transferencia nuclear” se refiere a un método de clonación en el que el núcleo de una célula donante es trasplantado a un oocito enucleado.

15 Secuencias codificadoras de proteínas de interés se pueden obtener mediante bancos de rastreo de material genómico o ARN mensajero inversamente traducido derivado del animal de elección (tal como ganado o ratones), obtenido de bases de datos de secuencias tales como NCBI, Genbak, u obteniendo las secuencias de anticuerpos, etc. Las secuencias se pueden clonar en un vector de plásmido apropiado y se pueden amplificar en un organismo hospedante adecuado tal como *E. coli*. Después de la amplificación del vector, la construcción de ADN se puede escindir, purificar de los restos del vector e introducir en vectores de expresión que se pueden utilizar para producir animales transgénicos. Los animales transgénicos tendrán la proteína transgénica deseada integrada en su genoma.

25 Después de la amplificación del vector, la construcción de ADN podría escindirse con las secuencias control 5' y 3' apropiadas, purificarse de los restos del vector y utilizarse para producir animales transgénicos que tengan integrada en su genoma la proteína transgénica relacionada no glicosilada deseada. A la inversa, con algunos vectores tales como cromosomas artificiales de levaduras (YACs – siglas en inglés) no es necesario separar la construcción ensamblada del vector; en tales casos, el vector amplificado se puede utilizar directamente para producir animales transgénicos. La secuencia codificadora puede ser enlazada operativamente a una secuencia control que permite que la secuencia codificadora sea expresada en la leche de un mamífero no humano transgénico.

30 Una secuencia de ADN que es adecuada para dirigir la producción a la leche de animales transgénicos puede portar una región de promotor 5' derivada de una proteína de la leche derivada de forma natural. Este promotor se encuentra, por consiguiente, bajo el control de factores hormonales y específicos para tejidos y tiene la mayor actividad en tejido mamario lactante. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de beta caseína caprina. El promotor puede estar enlazado operativamente a una secuencia de ADN que dirige la producción de una secuencia conductora de proteína que dirige la secreción de la proteína transgénica a través del epitelio mamario hacia la leche. En algunas realizaciones, para mejorar la estabilidad de ARNm se puede añadir una secuencia 3' que se puede derivar de una proteína de la leche secretada de forma natural.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, una “secuencia conductora” o “secuencia señal” es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una señal secretora de proteínas y que, cuando está operativamente enlazada a una molécula de ácido nucleico situada más abajo, codifica una proteína transgénica que dirige la secreción. La secuencia conductora puede ser la secuencia conductora humana nativa, un conductor derivado de manera artificial, o se puede obtener del mismo gen que el promotor utilizado para dirigir la transcripción de la secuencia codificadora del transgen, o de otra proteína que normalmente es secretada de una célula tal como una célula epitelial mamaria de mamíferos.

50 En algunas realizaciones, los promotores son promotores específicos para la leche. Tal como se utiliza en esta memoria, un “promotor específico para la leche” es un promotor que dirige de forma natural la expresión de un gen en una célula que secreta una proteína en la leche (p. ej. una célula epitelial mamaria) e incluye, por ejemplo, los promotores de caseína, p. ej. promotor de α -caseína (p. ej. promotor de caseína alfa S-1 y promotor de caseína alfa S-2), promotor de β -caseína (p. ej. el promotor del gen beta-caseína de cabra (DiTullio, BIOTECHNOLOGY 10:74-77, 1992), promotor de γ -caseína, promotor de κ -caseína, promotor de la proteína de carácter ácido del suero (WAP – siglas en inglés) (Gorton et al., BIOTECHNOLOGY 5: 1183-1187, 1987), promotor de β -lactoglobulina (Clark et al., BIOTECHNOLOGY 7: 487-492, 1989) y promotor de α -lactalbúmina (Soulier et al., FEBS LETTS. 297:13, 1992). También están incluidos en esta definición promotores que son específicamente activados en el tejido mamario tales como, por ejemplo, el promotor de repetición terminal larga (LTR – siglas en inglés) del virus del tumor mamario de ratón (MMTV – siglas en inglés).

60 Tal como se utiliza en esta memoria, se dice que una secuencia codificadora y una secuencia reguladora están “operativamente unidas” cuando están covalentemente enlazadas de modo que coloquen la expresión o transcripción de la secuencia codificadora bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Con el fin de

que las secuencias codificadoras sean traducidas en una proteína funcional, las secuencias codificadoras están unidas operativamente a secuencias reguladoras. Se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente, si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' resulta en la transcripción de la secuencia codificadora, y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) resulta en la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región de promotor para dirigir la transcripción de las secuencias codificadoras o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente a ser traducido en una proteína. Así, una región de promotor estaría unida operativamente a una secuencia codificadora si la región del promotor fuese capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que el transcrito resultante pudiera ser traducido en la proteína o polipéptido deseado.

Tal como se utiliza en esta memoria, un "vector" puede ser cualquiera de un cierto número de ácidos nucleicos en los que se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y ligamiento para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula hospedante. Los vectores están típicamente constituidos por ADN, a pesar de que también están disponibles vectores de ARN. Vectores incluyen, pero no se limitan a plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula hospedante y que, además, se caracteriza por uno o más sitios de restricción de endonucleasas en los que el vector puede ser cortado de un modo determinable y en los que se puede ligar una secuencia de ADN deseada de modo que el nuevo vector recombinante conserve su capacidad de replicarse en la célula hospedante. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que el plásmido aumenta en el número de copias dentro de la bacteria hospedante, o sólo una sola vez por hospedante a medida que el hospedante se reproduce por mitosis. En el caso de un fago, la replicación puede producirse activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en el que una secuencia de ADN deseada puede ser insertada mediante restricción y ligamiento de modo que esté operativamente unida a secuencias reguladoras y pueda expresarse como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener, además, una o más secuencias marcadoras, adecuadas para uso en la identificación de células que hayan o no hayan sido transformadas o transfectadas con el vector. Marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándares conocidos en la técnica (p. ej. β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células transformadas o transfectadas, hospedantes, colonias o placas. Vectores preferidos son aquellos que son capaces de una replicación autónoma y de una expresión de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que están operativamente unidos.

Se describe un método para la producción de un anticuerpo transgénico, y variantes y fragmentos del mismo, comprendiendo el procedimiento expresar en la leche de un mamífero transgénico no humano un anticuerpo transgénico codificado por una construcción de ácido nucleico. En una realización, el método para producir los anticuerpos de la invención comprende:

- (a) transfectar células de mamífero no humanas con una construcción de ADN transgénica que codifica un anticuerpo transgénico deseado;
- (b) seleccionar células en las que dicha construcción de ADN transgénico haya sido insertada en el genoma de las células; y
- (c) realizar un primer proceso de transferencia nuclear para generar un mamífero transgénico no humano heterocigótico para el anticuerpo transgénico deseado y que puede expresarse en su leche.

En otro aspecto, el método comprende:

- (a) proporcionar un mamífero transgénico no humano tratado mediante ingeniería genética para expresar un anticuerpo,
- (b) expresar el anticuerpo en la leche del mamífero transgénico no humano; y
- (c) aislar los anticuerpos expresados en la leche.

Métodos de este tipo pueden comprender, además, etapas para inducir la lactancia, así como etapas para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos obtenidos. Los métodos también pueden comprender etapas de aislamiento y/o purificación adicionales. Los métodos también pueden comprender etapas para comparar la actividad de ADCC de los anticuerpos obtenidos con anticuerpos producidos en cultivo de células. La actividad de ADCC de los anticuerpos obtenidos puede compararse, en algunas realizaciones, con los anticuerpos producidos por células epiteliales no mamarias. Este tipo de células pueden ser células de un cultivo de células. Técnicas experimentales para evaluar la actividad de ADCC de los anticuerpos pueden ser cualquiera de las conocidas por los expertos ordinarios en la técnica o según se proporcionan en esta memoria tal como, por ejemplo, en los **Ejemplos**. Los anticuerpos se pueden obtener, en algunas realizaciones, recogiendo los anticuerpos de la leche de un animal transgénico producida según se proporciona en esta memoria o de una cría de dicho animal transgénico.

En algunas realizaciones, la construcción que codifica el anticuerpo (o polipéptido de fusión a anticuerpo) deseado es impulsada por al menos un promotor de beta-caseína. En otras realizaciones, el mamífero transgénico no humano es un ungulado. Todavía en otras realizaciones, el mamífero transgénico no humano es una cabra.

- 5 En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos por el mamífero transgénico se producen a un nivel de al menos 1 gramo por litro de leche producida.

Animales transgénicos, capaces de una expresión de anticuerpos recombinantes, también se pueden generar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej. la patente de EE.UU. nº 5.945.577). Animales adecuados para la expresión transgénica incluyen, pero no se limitan a cabras, ovejas, bisontes, camellos, vacas, cerdos, conejos, búfalos, caballos, ratas, ratones o llamas. Animales adecuados incluyen también ganado bovino, caprino, ovino y porcino, los cuales se refieren a diversas especies de vacas, cabras, ovejas y cerdos (o cerdas), respectivamente. Animales adecuados incluyen también ungulados. Tal como se utiliza en esta memoria, “ungulado” es o se refiere a un mamífero cuadrúpedo, típicamente herbívoro, con pezuñas que incluye, sin limitación ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno y caballos. En una realización, los animales se generan co-transfectando células primarias con construcciones separadas que contienen las cadenas pesada y ligera. Estas células se utilizan luego para la transferencia nuclear. Alternativamente, si se utilizó micro-inyección para generar los animales transgénicos, las construcciones se co-inyectan. Si se necesitaran realizar alteraciones a los niveles de glicosilación, se puede utilizar en una realización, la mutagénesis dirigida al sitio.

La clonación resultará en una multiplicidad de animales transgénicos – cada uno de ellos capaz de producir un anticuerpo u otra construcción de gen de interés. Los métodos de producción incluyen el uso de los animales clonados y las crías de esos animales. En algunas realizaciones, los animales clonados son ganado caprino, bovino o ratones. La clonación abarca también la transferencia nuclear de fetos, transferencia nuclear, trasplante de tejidos y órganos y la creación de crías quiméricas.

Una etapa del proceso de clonación comprende transferir el genoma de una célula que contiene el transgen de interés a un oocito enucleado. Tal como se utiliza en esta memoria, “transgen” se refiere a cualquier trozo de una molécula de ácido nucleico que está insertado artificialmente en una célula o un antecesor de la misma y que se convierte en parte del genoma de un animal que se desarrolla a partir de esa célula. Un transgen de este tipo puede incluir un gen que es parcial o enteramente exógeno (es decir, extraño) al animal transgénico, o puede representar un gen que tenga identidad con un gen endógeno del animal.

Fuentes de mamíferos adecuadas para oocitos incluyen cabras, ovejas, vacas, cerdos, conejos, cobayas, ratones, hámsteres, ratas, primates no humanos, etc. Preferiblemente, los oocitos se obtienen de ungulados, y lo más preferiblemente de cabras o ganado vacuno. Métodos para el aislamiento de oocitos son bien conocidos en la técnica. Esencialmente, el proceso comprende aislar oocitos de los ovarios o del tracto reproductor de un mamífero, p. ej. una cabra. Una fuente fácilmente disponible de oocitos de ungulados es de animales hembras inducidos hormonalmente. Para el uso con éxito de técnicas tales como ingeniería genética, transferencia nuclear y clonación, los oocitos pueden ser preferiblemente madurados *in vivo* antes de que estas células se puedan utilizar como células receptoras para la transferencia nuclear y antes de que sean fertilizadas por la célula espermática para desarrollarse en un embrión. Oocitos de metafase II, que han sido madurados *in vivo* se han utilizado con éxito en técnicas de transferencia nuclear. Esencialmente, oocitos de metafase II maduros se recogen quirúrgicamente de animales no super-ovulados o super-ovulados varias horas después del comienzo del celo o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG – siglas en inglés) o una hormona similar.

Una de las herramientas utilizadas para predecir la cantidad y calidad de la proteína recombinante expresada en la glándula mamaria es través de la inducción de la lactancia (Ebert KM, 1994). La lactancia inducida permite la expresión y el análisis de proteínas procedentes de la fase temprana de la producción transgénica más que de la primera lactancia natural que resulta de la preñez, que es al menos de un año más tarde. La inducción de la lactancia se puede realizar ya sea hormonal o manualmente. Es posible que diversos procesos de lactancia, especialmente la lactancia inducida hormonalmente, puedan afectar a la regulación transcripcional de glicosiltransferasas en glándulas mamarias. Oligosacáridos N-enlazados procedentes de varias muestras de lactancia de animales clonados eran similares excepto por el contenido de NeuGc. Los hidratos de carbono en la producción de anticuerpos transgénicos a partir de la lactancia natural contenían mayores cantidades de NeuGc que de otros procesos de lactancia, incluso a pesar de que era equiparable el contenido en ácido siálico global en muestras de diferentes lactancias. Igualmente, parece ser que las proteínas transgénicas producidas en la leche de cabras están también constituidas por una mezcla compleja de especies de proteína individuales (Zhou, 2005).

Fracciones de IgG purificadas con proteína A, aisladas de muestras de leche agrupadas de cada una de las líneas se analizaron *in vitro* para caracterizar la especificidad de unión a anticuerpos y la afinidad y la mejora dependiente de la dosis de la proliferación de células T. En una realización, preparados quiméricos glicosilados y aglicosilados

derivados de la leche con respecto al mAb GW original.

Se estableció la producción de ratones transgénicos sanos con características de crecimiento y reproductoras normales y niveles razonables (> 1 mg/ml) de anticuerpo bioactivo. La producción en ratones con una construcción dada puede ser un precursor para trabajar en una producción a gran escala en especies tales como ganado caprino o bovino. La producción y caracterización de anti-CD137 quimérico condujo al ensayo de uno o más de estos preparados en un modelo de ratón para demostrar la actividad anti-tumoral *in vivo*. Las construcciones de anticuerpo quiméricas tanto glicosiladas como aglicosiladas se utilizaron después para generar cabras transgénicas para que expresaran anti-CD137 en su leche.

La capacidad de modificar los genomas de los animales a través de una tecnología transgénica ofrece nuevas alternativas al fabricante de proteínas recombinantes con modelos de glicosilación modificados. La producción de productos farmacéuticos recombinantes humanos en la leche de animales de granja transgénicos resuelve muchos de los problemas asociados con biorreactores microbianos (p. ej. carencia de modificaciones post-traducción, plegamiento inadecuado de proteínas, elevados costes de purificación) o biorreactores de células animales (p. ej. elevados costes de capital, medios de cultivo costosos, bajo rendimiento). La presente invención incluye, en algunas realizaciones, el uso de la producción transgénica de anticuerpos en la leche de animales transgénicos homocigóticos para un gen deseado que optimiza el modelo de glicosilación de esas moléculas.

De acuerdo con otra realización, el modelo de glicosilación de una molécula diana puede modificarse, por ejemplo, a través de la alteración en la alimentación a un mamífero no humano (Kerr et al., 2003).

Se describen además métodos para producir un anticuerpo, que comprenden recoger el anticuerpo de la leche de un mamífero transgénico no humano, tratado mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo en su leche, y determinar la actividad de ADCC del anticuerpo. En algunas realizaciones, la actividad de ADCC se compara con la actividad de ADCC de anticuerpos expresados en el cultivo de células. En otras realizaciones el anticuerpo se recoge de células epiteliales mamarias en cultivo tratadas mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo, y se determina la actividad de ADCC del anticuerpo. En algunas realizaciones, la actividad de ADCC se compara con la actividad de ADCC de anticuerpos expresados en cultivo de células. En algunas realizaciones, las células del cultivo de células son células epiteliales no mamarias. Se proporcionan a continuación ensayos para evaluar la actividad de ADCC en los **Ejemplos** y también se conocen en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “sustancialmente puras” significa que las proteínas están esencialmente exentas de otras sustancias en una medida práctica y apropiada para su uso pretendido. En particular, las proteínas son lo suficientemente puras y están lo suficientemente exentas de otros constituyentes biológicos de sus células hospedantes con el fin de ser útiles, por ejemplo, en la secuenciación de las proteínas, o para producir preparados farmacéuticos. En algunas realizaciones, por lo tanto, los anticuerpos son sustancialmente puros.

Tal como se utiliza en esta memoria con respecto a polipéptidos, “aislado” significa separado de su entorno natural y presentes en una cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Aislado, cuando se refiere a una proteína o polipéptido, significa, por ejemplo: (i) producido de forma selectiva mediante clonación de expresión o (ii) purificado tal como mediante cromatografía o electroforesis. Proteínas o polipéptidos aislados pueden, pero no necesitan ser sustancialmente puros. Debido a que un polipéptido aislado se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en un preparado farmacéutico, el polipéptido puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso del preparado. El polipéptido está, no obstante, aislado en el sentido de que ha sido separado de las sustancias con las que puede estar asociado en sistemas vivos, es decir, aislado de otras proteínas. En algunas realizaciones, por lo tanto, los anticuerpos están aislados.

Los anticuerpos exhiben una actividad de ADCC mejorada, lo cual es un factor importante en el uso con éxito de anticuerpos monoclonales en la terapia. La unión simultánea de la región constante o Fc de los anticuerpos de la invención puede inducir una respuesta biológica. Una de estas respuestas es la inducción de la apoptosis celular en la célula diana o ADCC. La ADCC funciona a través de la unión de la región Fc a los receptores gamma de Fc que están situados sobre la superficie de monocitos, macrófagos y células asesinas naturales. Tras la unión al receptor, estas células son activadas y liberan citoquinas y radicales libres oxidantes que pueden matar a la célula diana (la célula que contenía la diana antígeno).

Por lo tanto, en un aspecto se describen preparados de anticuerpos con actividad de ADCC incrementada y, por lo tanto, propiedades terapéuticas mejoradas. Las composiciones proporcionadas se pueden utilizar para tratar a un sujeto en el que la actividad de ADCC conferiría al menos algún beneficio médico. Por lo tanto, la composición proporcionada puede utilizarse para tratar a un sujeto con una enfermedad. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden utilizar para tratar a un sujeto mejorando la actividad de ADCC en un sujeto a través de la

administración del anticuerpo.

El término “tratando”, “tratar” o “tratamiento” tal como se utiliza en esta memoria incluye el tratamiento preventivo (p. ej. profiláctico) y paliativo.

5 Indicaciones específicas contra las que las composiciones podrían proporcionar efectos terapéuticos beneficiosos incluyen cáncer tal como un tratamiento inmunomodulador eficaz de tumores sólidos, melanomas; así como carcinomas de mama, colon, ovarios, riñón, próstata y pulmón.

10 “Cáncer” tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un crecimiento descontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales. Cánceres que migran desde su localización original e infestan órganos vitales pueden conducir finalmente a la muerte del sujeto a través del deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres incluyen linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, micosis fungoide/síndrome de Sezary, histiocitosis X, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, crioglobulinemia y enfermedad de las cadenas pesadas. Cánceres hematopoyéticos tales como leucemia son capaces de sobrepasar los compartimientos hematopoyéticos normales en un sujeto, conduciendo con ello a una insuficiencia hematopoyética (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia) provocando en última instancia la muerte.

20 Una metástasis es una región de células cancerígenas, distintas de la localización del tumor primario que resulta de la diseminación de células cancerígenas desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. En el momento del diagnóstico de la masa tumoral primaria, el sujeto puede ser monitorizado en cuanto a la presencia de metástasis. Lo más frecuentemente, las metástasis son detectadas a través del uso único o combinado de escaneos por imágenes de resonancia magnética (MRI), escaneos de tomografía computarizada (CT), sangre y recuentos de plaquetas, estudios de la función hepática, radiografías del tórax y escaneos de los huesos, además de la monitorización de síntomas específicos.

30 Cáncer, tal como se utiliza en esta memoria, incluye los siguientes tipos de cáncer, cáncer de mama, cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro incluidos glioblastomas y meduloblastomas; cáncer cervical, coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; leucemia; neoplasmas hematológicos, incluida leucemia linfocítica y mielógena aguda, leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T; leucemia de células pilosas; leucemia mielógena crónica; mieloma múltiple; leucemias asociada con el SIDA y leucemia/linfoma de células T del adulto; neoplasmas intraepiteliales que incluyen la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas que incluyen la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cánceres orales que incluyen carcinoma de células escamosas; cáncer de ovarios que incluyen los que proceden de células epiteliales, células del estroma, células germinales y células mesenquimales; cáncer pancreático; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas incluidos leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de la piel que incluye melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular y cáncer de células escamosas; cáncer testicular que incluye tumores germinales tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores del estroma y tumores de células germinales; cáncer del tiroides incluido adenocarcinoma del tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal incluido adenocarcinoma y tumor de Wilms. Otros cánceres serán conocidos por un experto ordinario en la técnica e incluyen mastocitoma, timoma, plasmacitoma y glioma.

45 Las composiciones de la invención son también útiles para tratar trastornos inmunes. Un “trastorno inmune” incluye síndrome de dificultad respiratoria del adulto, arteriosclerosis, asma, aterosclerosis, colecistitis, cirrosis, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, enfisema, hipereosinofilia, inflamación, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, miastenia grave, inflamación del miocardio o del pericardio, osteoartritis, osteoporosis, pancreatitis, artritis reumatoide, escleroderma y colitis (véase, p. ej., la solicitud de EE.UU. publicada 2003/0175754).

55 Las composiciones descritas en esta memoria son también útiles para tratar enfermedades autoinmunes que incluyen, pero no se limitan a lupus eritematoso sistémico, lupus nefritis, diabetes mellitus, enfermedad del intestino inflamatorio, enfermedad celiaca, una enfermedad del tiroides autoinmune, enfermedad de Addison, síndrome de Sjogren, corea de Sydenham, arteritis de Takayasu, granulomatosis de Wegener, gastritis autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedades autoinmunes cutáneas, cardiomiopatía dilatada autoinmune, esclerosis múltiple, miocarditis, miastenia grave, anemia perniciosa, polimialgia, psoriasis, glomerulonefritis rápidamente progresiva, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis, enfermedades autoinmunes de los músculos, enfermedades autoinmunes de los testículos, enfermedades autoinmunes de los ovarios y enfermedades autoinmunes de los ojos.

60 En otra realización, anticuerpos con actividad de ADCC incrementada son eficaces en el tratamiento de

encefalomielitis derivada del sistema autoinmune, lupus eritematoso sistémico así como otros estados patológicos.

Los anticuerpos proporcionados en esta memoria se pueden combinar con otros agentes terapéuticos. Los anticuerpos y otros agentes terapéuticos se pueden administrar de modo simultáneo o secuencial. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran de modo simultáneo, estos se pueden administrar en las mismas o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente uno con otro y con los anticuerpos cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y los anticuerpos está separada en el tiempo. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o puede ser más prolongada.

Otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a terapias anti-cáncer. Terapias anti-cáncer incluyen medicamentos anti-cáncer, radiación y procesos quirúrgicos. Tal como se utiliza en esta memoria, un "medicamento anti-cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el fin de tratar un cáncer. Tal como se utiliza en esta memoria, "tratar un cáncer" incluye prevenir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas del cáncer y/o inhibir el crecimiento de un cáncer establecido. En otros aspectos, el medicamento anti-cáncer se administra a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer con el fin de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. En esta memoria se describen diversos tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los fines de esta memoria descriptiva, los medicamentos anti-cáncer se clasifican como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, terapia hormonal y modificadores de la respuesta biológica.

El agente quimioterapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la farnesil transferasa RAS, inhibidor de la farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, hicantina/ topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, novantrona/mitroxantrona, Metaret/suramina, batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/valrubicina, metastrona/derivado de estroncio, Temodal/temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, Cyclopax/paclitaxel oral, taxoide oral, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT (Tegafur/uracilo), Ergamisol/Levamisol, Eniluracilo/potenciador 776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/irinotecán, Tumodex/Ralitrexed, leustatina/cladribina, Paxex/paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/fludarabina, Farmarubicina/epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/bis-naftalimida, LU 103793/dolastatina, Caetyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/dexifosamida, IFES/Mesnex/ifosamida, Vumon/tenipósido, Paraplatino/carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepesida/etopósido, ZD 9331, Taxotere/docetaxel, profármaco de la guanina arabinósido, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfelan y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparaginasa, busulfan, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinomicina, HCl daunorubicina, fosfato de estramustina de sodio, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxiurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, Interferón alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo de factor de liberación de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), mercaptopurina, Mesna, Mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, procarbazona HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametilmelamina (HMM), interleucina 2, mitoguzona (metil-GAG; metil-glioxal-bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina, pero no está limitado a ellos.

El agente inmunoterapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste de Ributaxina, Herceptina, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, OvaRex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAB-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT- CEA, pero no está limitado a ellos.

La vacuna contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en EGF, vacunas contra el cáncer anti-idiotípicas, antígeno Gp75, vacuna contra el melanoma GMK, vacuna contra el conjugado de gangliósido MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL, teratopo, BLP25 (MUC-1), vacuna idiotípica liposomal, melacina, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígenos, vacuna basada en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmuCyst/TheraCys, pero no está limitada a ellas.

5 Los agentes terapéuticos adicionales también pueden ser inmunomoduladores. Ejemplos de inmunomoduladores que se pueden administrar son IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, un interferón, paclitaxel, TNF- α o una combinación de los mismos, pero no están limitados a ellos. Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar en combinación con inmunomoduladores y/o agentes anti-cáncer adicionales tales como IL-21, IL-12 y/o trastuzumab.

10 Las composiciones proporcionadas son útiles en cantidades eficaces. La expresión cantidad eficaz se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para alcanzar un efecto biológico deseado. Combinado con las enseñanzas proporcionadas en esta memoria, eligiendo entre los diversos compuestos activos y factores de peso tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos secundarios adversos y modo preferido de administración, se puede planear un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoque una toxicidad sustancial y que, a pesar de ello, sea eficaz para tratar al sujeto particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar en función de factores tales como la enfermedad o el estado que esté siendo tratado, la composición particular que esté siendo administrada, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto ordinario en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición particular sin necesitar una experimentación excesiva. Generalmente, se prefiere utilizar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más elevada de acuerdo con el juicio médico. Para alcanzar niveles sistémicos apropiados de compuestos se pueden contemplar dosis múltiples al día. Niveles del sistema apropiados se pueden determinar, por ejemplo, midiendo el nivel en plasma del fármaco pico o sostenido en el paciente. "Dosis" y "dosificación" se utilizan de manera indistinta en esta memoria.

25 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz depende específicamente de factores tales como toxicidad y eficacia del medicamento. La toxicidad se puede determinar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. La eficacia se puede determinar utilizando la misma orientación. Por lo tanto, una cantidad farmacéuticamente eficaz es una cantidad que se considera por parte del médico toxicológicamente tolerable, aún así eficaz. La eficacia, por ejemplo, se puede medir por la inducción o la inducción sustancial de la citotoxicidad de linfocitos T en el tejido fijado como objetivo o una disminución en la masa del tejido fijado como objetivo. De acuerdo con una realización preferida, se espera que dosificaciones adecuadas sean de aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg.

35 De acuerdo con realizaciones que implican administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos según se proporcionan en esta memoria, "terapéuticamente eficaz" designa la cantidad de anticuerpo necesaria para inhibir o invertir una afección patológica (p. ej. reducir o inhibir el desarrollo del cáncer). Algunos métodos contemplan la terapia de combinación con medicamentos o terapias anti-cáncer conocidos, por ejemplo quimioterapia (preferiblemente utilizando compuestos de la clase listada en esta memoria) o radiación. El paciente puede ser un ser humano o un animal no humano. Típicamente, un paciente necesita tratamiento cuando padece un cáncer caracterizado por niveles incrementados de receptores que fomentan el mantenimiento o la proliferación del cáncer.

40 Generalmente, dosis orales diarias de compuestos activos serán de aproximadamente 0,01 miligramos/kg al día a 1000 miligramos/kg al día. Se espera que dosis orales en el intervalo de 0,5 a 50 miligramos/kg, en una o varias administraciones al día, proporcionen los resultados deseados. La dosificación puede ajustarse de manera apropiada para conseguir los niveles de fármaco deseados, locales o sistémicos, dependiendo del modo de administración. Por ejemplo, se espera que la administración intravenosa sea de un orden a varios órdenes de magnitud de dosis baja al día. En el caso de que la respuesta en un sujeto sea insuficiente a este tipo de dosis, se pueden emplear incluso dosis superiores (o dosis eficaces superiores mediante una vía de administración diferente, más localizada) en la medida en la que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan múltiples dosis al día para conseguir niveles sistémicos apropiados de anticuerpos.

50 En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas se emplean para aplicaciones *in vivo*. Dependiendo del modo de administración pretendido *in vivo*, las composiciones utilizadas pueden estar en la forma de dosificación de sólido, semisólido o líquido tal como, p. ej., comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, geles, ungüentos, líquidos, suspensiones, o similares. Preferiblemente, las composiciones se administran en forma de dosificación unitaria, adecuadas para la administración única de cantidades de dosificación precisas. Las composiciones también pueden incluir, en función de la formulación deseada, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables que se definen como vehículos de base acuosa, comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona con el fin de que no afecte a la actividad biológica de la proteína recombinante humana de interés. Ejemplos de diluyentes de este tipo son agua destilada, solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Los mismos diluyentes se pueden utilizar para reconstituir de forma liofilizada una proteína recombinante humana de interés. Además, la composición farmacéutica también puede incluir otros

5 agentes medicinales, agentes farmacéuticos, soportes, adyuvantes, estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, etc. Cantidades eficaces de un diluyente o soporte de este tipo son cantidades que son eficaces para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad de los componentes, actividad biológica, etc. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en esta memoria son estériles.

10 Las composiciones en esta memoria se pueden administrar a pacientes humanos por vía oral, parenteral o tópica u otras formas sistémicas para el tratamiento anti-melanoma, anti-linfoma, anti-leucemia y anti-cáncer de mama. Las composiciones también se pueden utilizar terapéuticamente para una gama de trastornos autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus sistémicos, esclerosis múltiple, etc.

15 La administración durante el tratamiento *in vivo* puede ser mediante cualquier número de vías, que incluyen la vía parenteral y oral, pero preferiblemente la parenteral. Se pueden emplear las vías de administración intracapsular, intravenosa, intratecal e intraperitoneal, siendo generalmente preferida la intravenosa. El experto reconoce que la vía de administración varía en función del trastorno a tratar.

20 Para uso en terapia, una cantidad eficaz de las composiciones se puede administrar a un sujeto por cualquier modo que suministre la composición a la superficie deseada. La administración de la composición farmacéutica descrita en esta memoria se puede conseguir por cualesquiera medios conocidos por el experto. Vías de administración preferidas incluyen, pero no se limitan a la oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratecal, por inhalación, ocular, vaginal y rectal.

25 Los compuestos, cuando es deseable suministrarles por vía sistémica, se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección p. ej. mediante inyección de bolo o infusión continua. Formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej. en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

30 Formulaciones farmacéuticas para la administración por vía parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

40 Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo, para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej. agua apirógena estéril, antes del uso.

45 Para la administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej. almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas, p. ej. lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno-fosfato de calcio; lubricantes, p. ej. estearato de magnesio, talco o sílice; desintegrantes (p. ej. fécula de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (p. ej. lauril-sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir por métodos bien conocidos en la técnica. Preparados líquidos para la administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar en forma de un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Preparados líquidos de este tipo se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej. jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej. lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej. aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej. p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales tampón, agentes saboreantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado.

60 Preparados para la administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, la composición puede adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de una manera convencional.

Para la administración por vía oral, por ejemplo, los anticuerpos se pueden formular fácilmente combinando los anticuerpos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Soportes de este

tipo permiten que los compuestos de la invención sean formulados en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones acuosas, suspensiones y similares, para la ingesta por vía oral por parte de un sujeto a tratar. Preparados farmacéuticos para uso oral se pueden obtener en forma de un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y tratando la mezcla de gránulos, después de añadir compuestos auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparados de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma tragacanto, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales se pueden también formular en disolución salina o tampones, es decir EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin soporte alguno.

También se contemplan específicamente formas de dosificación orales de los anticuerpos. El componente o los componentes pueden modificarse químicamente de modo que sea eficaz el suministro por vía oral de los anticuerpos. Generalmente, la modificación química contemplada es la fijación de al menos un resto a los anticuerpos, en que dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo procedente del estómago o del intestino. También se desea el incremento en la estabilidad global de los anticuerpos y el incremento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Ejemplos de restos de este tipo incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetil-celulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) polivinil-pirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: *Enzymes as Drugs*, Hochenberg y Roberts, comps., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, págs. 367-383; Newmark et al., 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189. Otros polímeros que podrían utilizarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Se prefieren para uso farmacéutico, tal como se ha indicado antes, restos de polietilenglicol.

Para las composiciones, la localización de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago pero que liberarán el material en el duodeno o en otra parte del intestino. Preferiblemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del entorno del estómago, ya sea mediante protección del anticuerpo o mediante liberación del material biológicamente activo más allá del entorno del estómago tal como en el intestino.

Para asegurar una resistencia gástrica completa, es esencial un revestimiento impermeable a al menos pH 5.0. Ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se utilizan como revestimientos entéricos son acetato-trimelitato de celulosa (CAT – siglas en inglés), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP – siglas en inglés), HPMCP 50, HPMCP 55, poli(acetato-ftalato de vinilo) (PVAP – siglas en inglés), Eudragit L30D, Aquateric, acetato-ftalato de celulosa (CAP – siglas en inglés), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos revestimientos se pueden utilizar en forma de películas mixtas.

Un revestimiento o mezcla de revestimientos también se puede utilizar en comprimidos que no estén destinados para la protección frente al estómago. Éstos pueden incluir revestimientos de azúcares o revestimientos que hacen al comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una envuelta dura (tal como gelatina) para el suministro del producto terapéutico seco, es decir, polvo; para formas líquidas se puede utilizar una envuelta de gelatina blanda. El material de la envuelta de sellos podría ser almidón espeso o incluso papel comestible. Para píldoras, pastillas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden utilizar técnicas de formación de masa en húmedo.

El agente terapéutico puede estar incluido en la formulación en forma de materiales en múltiples partículas finas en forma de gránulos o nódulos de un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de la cápsula también podría ser en forma de un polvo, tacos ligeramente comprimidos o incluso en forma de comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse por compresión.

Colorantes y agentes saboreantes pueden estar todos ellos incluidos. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular (tal como mediante encapsulación en liposomas o microsferas) y luego pueden estar adicionalmente contenidas dentro de un producto comestible tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saboreantes.

Se puede diluir o incrementar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Los diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, a-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se pueden utilizar determinadas sales inorgánicas en calidad de cargas, incluidos trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Desintegrantes pueden estar incluidos en la formulación del agente terapéutico en una forma de dosificación sólida. Materiales utilizados como desintegrantes incluyen, pero no se limitan a almidón, incluido el desintegrante comercial basado en almidón, Explotab. Almidón glicolato de sodio, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, piel de la naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita se pueden utilizar todos ellos. Otra forma de los desintegrantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Gomas en forma de polvo se pueden utilizar en calidad de desintegrantes y como aglutinantes, y éstas pueden incluir gomas en forma de polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. Ácido alginico y su sal sódica son también útiles como desintegrantes.

Los aglutinantes se pueden utilizar para mantener unido al agente terapéutico para formar un comprimido duro, e incluyen materiales de productos naturales tales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Polivinil-pirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) podrían ambas utilizarse en disoluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

Un agente anti-fricción se puede incluir en la formulación del agente terapéutico para prevenir que se pegue durante el proceso de formulación. Lubricantes pueden utilizarse en forma de una capa entre el agente terapéutico y la pared de la matriz, y éstos pueden incluir, pero no se limitan a: ácido esteárico, incluidas sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden utilizar lubricantes solubles tales como lauril-sulfato de sodio, lauril-sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Podrían añadirse deslizantes que pudieran mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar al re-ordenamiento durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso podría añadirse un tensioactivo en calidad de un agente humectante. Tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como lauril-sulfato de sodio, dioctil-sulfosuccinato de sodio y dioctil-sulfonato de sodio. Podrían utilizarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de benzetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación en calidad de tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetil-celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación ya sea solos o en forma de una mezcla en diferentes relaciones.

Preparados farmacéuticos que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión (de dos piezas) hechas de gelatina así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden utilizar microesferas formuladas para la administración por vía oral. Microesferas de este tipo han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para la administración por vía oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para este tipo de administración.

Para la administración por vía bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de una manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación en spray de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un agente propulsor adecuado, p. ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos, p. ej. de gelatina, para uso en un inhalador o insuflador de modo que contengan una mezcla de polvos del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

También se contempla en esta memoria una administración pulmonar. Las composiciones se pueden suministrar a los pulmones de un mamífero mientras está inhalando y atraviesa el revestimiento epitelial de los pulmones hacia el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al, 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569; Adjei et al, 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet et al, 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suplemento 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard et al, 1989,

Annals of Internal Medicine, vol. III, págs. 206-212 (antitripsina a1); Smith et al, 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146 (proteínasa a-1); Oswein et al, 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, marzo, (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488 (interferón-g y factor alfa de necrosis tumoral) y Platz et al., patente de EE.UU. N° 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos). Un método y una composición para la administración pulmonar de fármacos para efecto sistémico se describe en la patente de EE.UU. N° 5.451.569, expedida el 19 de septiembre 1995 a Wong et al.

Se puede utilizar una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos que incluyen, pero no se limitan a nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles, adecuados, son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todo este tipo de dispositivos requiere el uso de formulaciones adecuadas para la administración. Típicamente, cada una de las formulaciones es específica para el tipo de dispositivo empleado, y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o soportes habituales, útiles en terapia. También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de soportes. Anticuerpos químicamente modificados también se pueden preparar en diferentes formulaciones, dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, comprenderán típicamente el agente terapéutico disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de agente terapéutico biológicamente activo por mL de disolución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (p. ej. para la estabilización del anticuerpo y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener un tensioactivo para reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie del agente terapéutico provocada por la atomización de la disolución para formar el aerosol.

Formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderá generalmente un polvo finamente dividido que contiene el agente terapéutico suspendido en un agente propulsor con ayuda de un tensioactivo. El agente propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin tal como un clorofluorocarbono, un hidroxifluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluido triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

Formulaciones para ser dispensadas de un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el agente terapéutico y también pueden incluir un agente conferidor de consistencia tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo a partir del dispositivo, p. ej. 50 a 90% en peso de la formulación. El agente terapéutico se puede preparar en forma de partículas con un tamaño medio de partícula de menos de 10 μ m (o micras), lo más preferiblemente de 0,5 a 5 μ m para la administración más eficaz al pulmón distal.

También se contempla la administración nasal de una composición farmacéutica descrita en esta memoria. La administración nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente sanguíneo, directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de una deposición del producto en los pulmones. Formulaciones para la administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.

Para la administración nasal, un dispositivo útil es un frasco pequeño y duro al que se fija un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se suministra extrayendo la composición farmacéutica de la disolución de la presente invención en una cámara de volumen definido, cámara que tiene una abertura dimensionada para suministrar mediante aerosol una formulación de aerosol formando un spray cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una realización específica, la cámara es una disposición de pistón. Dispositivos de este tipo están disponibles en el comercio.

Alternativamente, se utiliza un frasco exprimible de plástico con una abertura u orificio dimensionado para

5 suministrar mediante aerosol una formulación de aerosol formando un spray cuando se exprime. El orificio se encuentra habitualmente en la parte superior del frasco, y la parte superior está generalmente ahusada para encajar parcialmente en los conductos nasales para una administración eficaz de la formulación de aerosol. Preferiblemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación de aerosol para la administración de una dosis medida del fármaco.

10 Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej. que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

15 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como un preparado de depósito. Formulaciones de larga actuación de este tipo se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo como una sal escasamente soluble.

20 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender soportes o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Ejemplos de soportes o excipientes de este tipo incluyen, pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

25 Formas de preparados farmacéuticos líquidos o sólidos adecuadas son, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para la inhalación, microencapsuladas, cocleadas, revestidas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, gránulos para la implantación en la piel o secadas sobre un objeto afilado para ser rallado en la piel. Las composiciones farmacéuticas incluyen también gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparados con liberación retraída de compuestos activos, en cuya preparación se utilizan habitualmente excipientes y aditivos y/o agentes auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de expansión, lubricantes, saboreantes, edulcorantes o solubilizantes, según se ha descrito arriba. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de métodos para la administración de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533, 1990.

35 Los anticuerpos y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos se pueden administrar *per se* (puros) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero sales no farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Este tipo de sales incluyen pero no se limitan a las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico y bencenosulfónico. También se pueden preparar sales de este tipo en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

40 Agentes tampón adecuados incluyen: ácido acético y una sal (al 1-2% p/v), ácido cítrico y una sal (al 1-3% p/v); ácido bórico y una sal (al 0,5-2,5% p/v) y ácido fosfórico y una sal (al 0,8-2% p/v). Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (al 0,003-0,03% p/v); clorobutanol (al 0,3-0,9% p/v); parabenos (al 0,01-0,25% p/v); y timerosal (al 0,004-0,02% p/v).

45 Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria contienen una cantidad eficaz de los anticuerpos y, opcionalmente, agentes terapéuticos incluidos en un soporte farmacéuticamente aceptable. La expresión soporte farmacéuticamente aceptable significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano o a otro animal vertebrado. El término soporte designa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas son también capaces de ser mezclados conjuntamente con los compuestos de la presente invención, y uno con otro de tal manera que no existe interacción que perjudicara sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

55 El o los agentes terapéuticos, que incluyen específicamente pero no se limitan a los anticuerpos, pueden proporcionarse en partículas. Partículas, tal como se utiliza en esta memoria, significan nanopartículas o micropartículas (o en algunos casos mayores) que pueden consistir, en su totalidad o en parte, en el anticuerpo. Las partículas pueden contener el o los agentes terapéuticos en un núcleo rodeado por un revestimiento que incluye, pero no se limita a un revestimiento entérico. El o los agentes terapéuticos también se pueden dispersar por las partículas. El o los agentes terapéuticos también se pueden adsorber en las partículas. Las partículas pueden ser de cinética de liberación de cualquier orden, que incluyen la liberación de orden cero, liberación de

orden primero, liberación de orden segundo, liberación retardada, liberación sostenida, liberación inmediata y cualesquiera combinaciones de las mismas, etc. La partícula puede incluir, además del o de los agentes terapéuticos, cualquiera de los materiales habitualmente utilizados en la técnica de farmacia y medicina que incluyen, pero no se limitan a material erosionable, no erosionable, biodegradable o no biodegradable, o combinaciones de los mismos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen el anticuerpo en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser virtualmente de cualquier forma.

En la fabricación de partículas para suministrar el o los agentes terapéuticos se pueden utilizar materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables. Polímeros de este tipo pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en base al período de tiempo a lo largo del cual se desea la liberación. Polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26: 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en esta memoria. Éstos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

El o los agentes terapéuticos pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. La expresión "liberación controlada" pretende aludir a cualquier formulación con contenido en fármacos en la que se controla la manera y el perfil de liberación del fármaco a partir de la formulación. Esto alude a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, incluyendo las formulaciones de liberación no inmediata, pero no limitándose a formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada. La expresión "liberación sostenida" (a la que se alude también como "liberación prolongada") se utiliza en su sentido convencional para aludir a una formulación de fármaco que proporcione una liberación gradual de un fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado y que, preferible aunque no necesariamente, resulta en niveles en sangre esencialmente constantes de un fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado. La expresión "liberación retardada" se utiliza en su sentido convencional para aludir a una formulación de fármaco en la que existe una demora en el tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco a partir de ella. "Liberación retardada" puede o puede no implicar una liberación gradual del fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado y, así, puede o no puede ser una "liberación sostenida".

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. Liberación "a largo plazo", tal como se utiliza en esta memoria, significa que el implante se construye y dispone para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 7 días y, preferiblemente, 30-60 días. Implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación arriba descritos.

También se proporcionan en esta memoria kits que contienen los anticuerpos proporcionados. La Fig. 14 muestra un ejemplo de un kit de este tipo. El kit 10 incluye un anticuerpo 12. El kit 10 también puede contener uno o más viales o recipientes 14. El kit incluye también instrucciones para administrar el o los componentes a un sujeto que padece una enfermedad descrita en esta memoria tal como cáncer o que tiene síntomas de una enfermedad de este tipo.

En algunas realizaciones, el kit 10 puede incluir un vial de un preparado farmacéutico, un vial diluyente de un preparado farmacéutico y los anticuerpos. El vial que contiene el diluyente para el preparado farmacéutico es opcional. El vial diluyente contiene un diluyente tal como solución salina fisiológica para diluir lo que podría ser una disolución concentrada o un polvo liofilizado del anticuerpo. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para mezclar una cantidad particular del diluyente con una cantidad particular del preparado farmacéutico concentrado, con lo que se prepara una formulación final para inyección o infusión. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para uso en una jeringa u otro dispositivo de administración. Las instrucciones 20 pueden incluir instrucciones para tratar a un paciente con una cantidad eficaz de los anticuerpos. También se entenderá que los recipientes que contienen los preparados, ya sea el recipiente un frasco, un vial con un tabique, una ampolla con un tabique, una bolsa de infusión, y similares, pueden contener indicios tales como marcas convencionales que cambian de color cuando el preparado ha sido sometido a autoclave o esterilizado de otra manera.

Un "sujeto" debe dar a entender un ser humano o mamífero vertebrado que incluye, pero no se limita a un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra o primate, p. ej. mono.

A menos que se defina de otro modo en esta memoria, términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención han de tener los significados que se entienden habitualmente por parte de un experto ordinario en la técnica. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, términos o expresiones en singular deben incluir plurales, y términos en plural deben incluir el singular. Los métodos y las técnicas de la presente

invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con y las técnicas de bioquímica, enzimología, biología molecular y celular, microbiología, genética y química de proteína y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en esta memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan a lo largo de la presente solicitud, a menos que se indique de otro modo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Secuenciación de ARNm a partir de hibridoma

Se preparó ARN con un Mini kit de Qiagen RNeasy (Cat nº 74104). En el 4º día, se centrifugaron 13 ml de cultivo durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS. Se centrifugó de nuevo durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 600 µl de RNeasy RLT que contenía 6 µl de μ -ME. El lisado se hizo pasar a través de una aguja de 22g 5 veces y se añadieron y mezclaron 600 µl de EtOH al 70%. Partes alícuotas de setecientos µl se aplicaron a la columna RNeasy dos veces, se centrifugó durante 30 segundos y se lavó con 700 µl de RW1. Se lavó dos veces con 500 µl de PPE, se secó durante 1 minuto y se eluyó con 50 µl de agua dos veces.

Dos µl del ARN se transcribieron de forma inversa con el Sistema de Transcripción Inversa Promega (Cat nº A3500) usando cebadores oligodT. La reacción se incubó a 42°C durante 1 hora y después se calentó hasta 95°C durante 5 minutos. Después, la reacción se diluyó hasta 100 µl con agua. La PCR se llevó a cabo en partes alícuotas de 1 de µl de ADNc utilizando cebadores escogidos de uno para el extremo N o extremo 5' y otro para el extremo C o extremo 3'. La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores sólo de la región constante como control positivo.

Productos de la PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QiaQuick de Qiagen (Cat nº 28104). Se realizó una elución adicional para que el volumen final fuese de 100 µl. Se midió la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones variaron desde 10 - 26 ng/µl y se añadieron 100 ng para la secuenciación junto con el cebador a lo largo del extremo N utilizado para la PCR.

Dado que los cebadores amino terminales utilizados eran parte de la secuencia codificadora del extremo amino del anticuerpo, éstos podrían introducir mutaciones en la secuencia. Utilizando las secuencias obtenidas, los genes de la línea germinal se identificaron a partir del genoma del ratón. A continuación, se sintetizaron cebadores a extremos de estos genes para la PCR de toda la secuencia codificadora del ADNc. De esta manera toda la región codificadora del anticuerpo se obtuvo libre de cualquiera de las secuencias presentadas por cebadores de la PCR. La secuencia codificadora es la secuencia del anticuerpo expresado, ya que es consistente con la secuencia amino terminal en cada caso. Las regiones J se identificaron a partir de las regiones J conocidas como anotadas en la secuencia.

Clonación y secuenciación de los genes de la cadena pesada y ligera para anti-CD137 humano

Se construyeron vectores de expresión de los transgenes que contienen secuencias de la región constante humana para las cuatro subclases principales de IgG. Estos vectores portan el promotor de beta-caseína de cabra y otras secuencias reguladoras 5' y 3' que aseguran la expresión de los transgenes específicos para mamas. La variante de anticuerpo quimérico se construyó mediante la inserción de las secuencias de región variable de un anticuerpo anti-CD137 humano de ratón. Las cadenas H y L de anti-CD de 137 de las secuencias murinas se identificaron por secuenciación de la región variable correspondiente. Se ensambló una colección de oligonucleótidos que representan secuencias de la región codificadora 5' de diversas familias de inmunoglobulinas murinas. Las secuencias de inmunoglobulinas murinas se utilizan individualmente como cebadores 5' para amplificar el ADNc preparado a partir de ARN de hibridoma, y los productos resultantes de la PCR se clonaron y secuenciaron. Los cebadores de PCR 3' se prepararon a partir de las secuencias conocidas de las regiones constantes. Los cebadores de PCR incluían sitios de endonucleasas de restricción de manera que las secuencias amplificadas resultantes podían ser insertadas en vectores de expresión. Estas secuencias se insertaron en las construcciones para producir genes que codifican proteínas quiméricas.

Los métodos utilizados para clonar y secuenciar las regiones variables de los genes de anticuerpos anti-CD137 incluían las siguientes etapas 1)-5). 1) ADNc se preparó a partir de ARN del hibridoma. Los ARN se prepararon a

partir del hibridoma mediante métodos estándar, y se prepararon ADNc mediante transcripción inversa con un kit de reactivos disponible comercialmente (Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI). 2) ADNc se amplificó por PCR con cebadores basados en secuencias conocidas del extremo amino de las regiones V_H y V_L de varios anticuerpos monoclonales murinos bien caracterizados. 3) Las secuencias de la región variable se amplificaron mediante la inserción de las secuencias generadas por PCR en vectores de clonación con el marcador seleccionable de resistencia a la neomicina (neo^R), y se aislaron colonias neo^R. 4) El ADNc de las cadenas H y L, preparado a partir de aproximadamente 6 colonias, se secuenció para determinar la secuencia de consenso para cada región variable. Era importante para garantizar que no se habían introducido mutaciones en las secuencias de los artefactos de PCR. La secuenciación del ADN se realizó sobre una base de pago por servicio SequeGen, Co. (Worcester, MA). 5) Las proteínas H y L aisladas a partir del sobrenadante del hibridoma se secuenciaron, y las secuencias de proteínas reales se compararon con las secuencias de proteínas deducidas, derivadas de las secuencias de genes. Esta etapa confirmó que los genes clonados codifican cadenas de anticuerpo funcionales. La secuenciación de proteínas se realizó sobre una base de pago por servicio por Cardinal Health (San Diego, CA).

15 *La producción de construcciones de cadena pesada y ligera de IgG quimérica independiente para anticuerpos quiméricos:*

Secuencias de la región variable, obtenidas de acuerdo con los métodos arriba proporcionados, se utilizaron para reemplazar secuencias de la región variable humana en un anticuerpo IgG1 humano existente. En una realización de la invención se utilizaron secuencias de la región variable humana en vectores de expresión de IgG1 junto con secuencias de la región variable murina para producir un anticuerpo humanizado quimérico. Los vectores de expresión de anticuerpos contenían el gen H de IgG1 en su forma nativa glicosilable. El sitio de glicosilación de IgG1 es un residuo Asn en la posición 297 en el dominio CH2. Una forma aglicosilada de la cadena H de IgG1 fue generada mediante la alteración de Asn₂₉₇ a Gln₂₉₇ por mutagénesis específica para el sitio en la secuencia del gen. Esto proporcionó tres construcciones: la cadena L, la cadena H glicosilada y la cadena H aglicosilada. Dos formas de cada una de las construcciones se utilizaron para el ensayo. Cada una de las construcciones fue evaluada mediante representación en mapa de restricción y análisis de transferencia Southern y se utilizó para la generación de animales transgénicos. Además, las construcciones fueron utilizadas en estudios de transfección transitoria para someter a ensayo la bioactividad de la proteína quimérica tratada mediante ingeniería genética.

Las construcciones usadas para el desarrollo animal transgénico contenían el promotor de β-caseína de cabra y otras secuencias reguladoras 5' y 3' que se utilizan para asegurar una expresión del transgen específico para mamas de alto nivel. Debido al reconocimiento de especies cruzadas del promotor y otros elementos reguladores, se utilizó la misma construcción para generar ratones y cabras transgénicos. Una vez criados, las cabras y/o ratones fueron examinados en cuanto a niveles de glicosilación y propiedades de ADCC mejoradas. Se confirmó la integridad estructural de las construcciones por representación en mapa de restricción. Las construcciones se utilizaron para producir células transfectadas transitoriamente y animales transgénicos.

40 *Construcción de quimera de cadena pesada e inserción en vector de expresión*

Con el fin de construir la quimera de cadena pesada con lo que la región constante de IgG2a de ratón fue sustituida por la región constante de IgG1 humana, se utilizó el vector de expresión BC2083 que contiene las secuencias de anticuerpo humano con una secuencia conductora de ratón (plásmido 1). Un sitio donante de corte y empalme fue eliminado por una mutación silenciosa de G a A que no cambió la codificación para la glicina cerca del extremo C. Sitios únicos se colocaron en el vector de expresión BC2083 que rodea la región variable. DraIII PmlI y se pusieron en el extremo N-terminal y ApaI existe en la porción amino de la región constante pesada. Estos sitios fueron clonados en los sitios XhoI de BC2083 por PCR del gen de CMV-Zeo con los cebadores para dar p80 BC2083 zeo (plásmido 2). Este método rápido de inserción del sitio de restricción en plásmidos utiliza la resistencia a zeocina conferida por el gen zeo. La resistencia a zeocina fue seleccionada mediante el uso de 25 µg/ml de zeocina en agar NZYCM.

La parte constante IgG1 humana fue puesta de nuevo en los sitios únicos ApaI y XhoI cortándolo de BC2083 y clonación en p80 para dar IgG1 de p83 BC2083 DraIII (plásmido 3). Este plásmido tiene sitios DraIII / PmlI y ApaI únicos que flanquean la región variable pesada de modo que cualquier región variable pesada se une a las secuencias codificadoras de la región de IgG1 humana.

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD137 se preparó para la inserción disponiendo por PCR sitios DraIII y PmlI en el extremo amino y un sitio de ApaI en el extremo C. El sitio ApaI es de origen natural cerca del extremo amino terminal de la región constante de IgG1 humana. La PCR se realizó con los cebadores MHE y MHEC usando PfuTurbo (Stratagene Cat. N° 600153-81) y ADNc. El fragmento de PCR se clonó en pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen cat N°: K28602) y se secuenció con los cebadores pcr2.1f y pcr2.1b. Esto dio p96, que contiene la región variable de cadena pesada flanqueada por DraIII-PmlI y ApaI (plásmido 4).

El vector de expresión de beta-caseína, p100 BC2083 heavy (BC2197) (plásmido 5) fue construido aislando el fragmento DralIII-Apal p96 PCR BluntII-Mayo-heavy y ligándolo a corte DralIII-Apal cut p83 BC2083 DralIII IgG1 (plásmido 3).

5 Para bloquear la glicosilación cambiando la asparagina diana por una glutamina, la secuencia que codifica la cadena pesada se preparó por PCR con PfuTurbo de BC2083 utilizando cebadores N constante pesados y C constante pesados, subclonados en pCR-Zero-Blunt. Esto dio p76 y p77 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-constant. Estos plásmidos fueron secuenciados para asegurar que no se introdujeron mutaciones en la región constante durante la PCR. De acuerdo con una realización, la región constante subclonada del anticuerpo anti-CD137 en p77 se mutagenizó usando el kit de mutagénesis QuickChange XL (Stratagene) y los oligos mutagénicos. Este oligo cambió asparagina 297 por una glutamina y separa un sitio cercano a BsaAI para facilitar el rastreo por análisis de enzima de restricción por la mutación silenciosa de un codón de treonina. Esto proporcionó los plásmidos p88, p89 y p90 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-mut. La PCR se llevó a cabo en estos plásmidos con los cebadores para preparar un fragmento para la secuenciación.

Construcción de Quimera de cadena ligera e inserción en vector de expresión

20 El vector de expresión utilizado para la cadena ligera era BC1060 (plásmido 6). Para permitir la fusión de la región variable a la región constante kappa humana, dos sitios de restricción fueron tratados mediante ingeniería en la región J del ratón en orden. Un sitio KpnI se introdujo mediante el cambio del codón por una glicina de GGG a GGC a GGT. La secuencia codificadora para una leucina fue cambiada a CTT a partir de CTG para crear un sitio HindIII (plásmido 8).

25 Utilizando la PCR con PfuTurbo (Stratagene), la región codificadora de la región constante humana de la cadena kappa se aisló de BC1060 con sitios KpnI y HindIII al principio y un sitio SacI que se produce de modo natural cerca del final de la región codificadora usando cebadores. El producto de PCR se clonó en ZERO Blunt TOPO PCR W EC (Invitrogen cat N°: K286020). Estos plásmidos fueron secuenciados. Esto produjo p85 pcr-blunt-1060 kappa constant rev (plásmido 7) y p86 pcr-blunt-1060 kappa constant (plásmido 8).

30 De manera similar, la región variable se aisló a partir de ADNc por PCR con cebadores y se clonó en pCR2.1-Blunt-TOPO para producir p92 pCR2.1-Blunt-kappa variable (plásmido 9), en que la región variable está flanqueada por un sitio XhoI en el nucleótido 340 y sitios KpnI y HindIII alrededor del nucleótido 731. Estos plásmidos fueron secuenciados.

35 La quimera de cadena ligera fue construida primero en pCR-Blunt utilizando 3 trozos de ADN. La cadena principal de XhoI a SacI fue suministrada por p86 pcr-blunt-1060 kappa constant. La región kappa constante era el trozo HindIII-SacI de p85 pcr-blunt-1060 kappa constant rev. La región variable fue suministrada por p92 pcr-blunt-kappa variable rev usando el trozo XhoI-HindIII. Las colonias fueron verificadas por PCR con los cebadores pcr2.1f y pcr2.1b mediante la búsqueda de la producción de un fragmento de 863 pb. Esto da p94 pcr-BluntII-Mayo-kap-chim (plásmido 10). El plásmido se comprobó mediante corte con XhoI y SacI para dar un fragmento de 684 pb.

45 La quimera de cadena ligera se dispuso en el vector de expresión de beta-caseína BC1060 contiene la cadena ligera humana Immunogen con la secuencia conductora pesada de ratón. p94 fue cortado con XhoI-SacI, y se aisló el trozo pequeño. BC1060 se cortó con KpnI-SacI, y se aisló el trozo de 5206 pb. BC1060 se cortó con KpnI, XhoI y PacI para aislar la gran cadena principal. Estos tres trozos se ligaron, y las colonias se seleccionaron con los cebadores necesarios. El plásmido positivo se verificó con BglII, y se secuenció el producto de la PCR. Este plásmido es p104 BC1060 LC Chim (BC2198) (plásmido 11).

Construcción de vectores de expresión de cultivo de células

55 Para construir el vector de expresión transitoria para la cadena ligera, el fragmento XhoI de p104 BC1060 LC chim (plásmido 11) se ligó en el sitio XhoI de pCEP4 para dar p106 y p107 pCEP4-Mayo-LC (n° 2203) (plásmido 12). Las colonias positivas se detectaron por PCR con oligos CEPF y KVC.

Para construir el vector de expresión transitoria para la cadena pesada, el fragmento BamHI de p100 BC2083 cadena pesada se clonó en BamHI cut pCEP4. Las colonias fueron rastreadas por PCR con HVC 09 y CEPF. Esto resultó en el plásmido p110 pCEP4-BamHI-HC (n° 2202) (plásmido 13).

60 La quimera con la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD137 se preparó ligando el trozo pequeño KpnI-AgeI de n° 110 pCEP4-BamHI-HC (n° 2202) que contiene la región variable en KpnI-AgeI cut # 88 pCR2.1-Blunt-IgG1-heavy-mut. Esto da el plásmido p111 pCR2.1-Mayo-IgG1-heavy-mut (plásmido 14). Este

plásmido se verificó con BsaAI-PstI.

5 Para construir el vector de expresión transitoria, el fragmento XhoI pequeño de p111 que contiene la región codificadora del anticuerpo quimérico se insertó en el sitio XhoI de pCEP4. Las colonias se verificaron por PCR con HVC C09 y CEPF. Esto dio p112 pCEP4-XhoI-Mayo-IgG1-aglycos (BC2206). Fragmentos esperados se obtuvieron con la digestión EcoRV-HindIII (2479 pb) y la digestión BamHI (1454 pb). Para construir el vector de expresión de beta-caseína, el fragmento XhoI pequeño de p111 que contiene la región codificadora de anticuerpo quimérico se insertó en el sitio XhoI de BC2083. Las colonias se verificaron por PCR con oligos de HVC 09 y CA5. La digestión con MluI-Eco47III-NotI dio el fragmento de 2479 pb esperado, mientras que la digestión con BamHI dio el fragmento de 1454 pb esperado.

Clonación de un Mutante de IgG1

15 El anticuerpo anti-CD137 utilizado fue expresado en leche de ratón. Para la expresión en ratón, se utilizaron las técnicas de construcción para BC2197 (BC2083 p100 pesado) y (BC2198) p104 BC1060 cadena ligera. Del mismo modo, los plásmidos parentales eran BC2083 para la cadena pesada o BC 1060 para la cadena ligera. Básicamente, las regiones variables, incluidas las secuencias conductoras en los plásmidos parentales se intercambiaron con la secuencia de ADNc de la región variable de las cadenas pesada y ligera del ADNc del anticuerpo anti-CD137. Las regiones constantes del vector de expresión se reemplazaron, IgG1 de la cadena pesada y kappa de la cadena ligera, con secuencias que fueron clonadas.

Clonación de secuencias de IgG1

25 La cadena pesada del anticuerpo utilizado fue clonada a partir de un ADNc adquirido de Invitrogen. La PCR con PfuTurbo se realizó usando ADNc de placenta y los cebadores que se muestran abajo. El cebador 61960C11 del extremo C tiene un cambio de base con respecto a la secuencia de tipo salvaje para destruir un sitio de donante de corte y empalme. El fragmento de 993 pb se clonó en ZeroBlunt. Las secuencias indicaron que una secuencia era la de G1m (3). Existen diferencias heredadas asociadas con gamma-globulina de suero humano (Grubb 1956; Grubb y Laurell 1956). Existe un sistema similar para Km (marcador Kappa, denominado previamente como Inv (o Inv), que representa el inhibidor de la inhibición). Esta es el alotipo G1m(f) o G1m(3) caucásico en lugar del alotipo G1m(z) o G1m(17) africano como se encuentra en el plásmido de partida.

30 Con el fin de clonar el otro alotipo, la PCR se realizó a partir de un ADNc de cerebro como anteriormente para dar los plásmidos p116, p117, p118 y p119. Ninguno de estos plásmidos tenía la secuencia correcta. Por ejemplo, la mayoría de los plásmidos carecía de los sitios ApaI y/o XhoI al final de la secuencia, los cuales deberían haber sido proporcionados por los cebadores de PCR. La PCR se realizó de nuevo usando p116 como molde o ADNc de cerebro.

40 La PCR de p116 proporcionó 121, 122 y 123. La PCR de ADNc de cerebro proporcionó 124. El inserto del plásmido 121 fue utilizado para producir p133, p134, p135 y p136, que son BC2083 G1m(17) pesado, cortando 100c BC2083 pesada con ApaI y XhoI, y p121 ZeroBlunt-IgG1 G1m(17) con ApaI y XhoI, y ligando y seleccionando en kanamicina. Se usó p133.

45 Para la expresión en ratón, sólo las regiones variables se cambiaron en el plásmido BC2083, un vector de expresión que contiene las secuencias de anticuerpo humano con una secuencia conductora de ratón. Esto tiene un sitio donante de corte y empalme en el extremo de la región constante de IgG1 eliminado por una mutación silenciosa de G a A que no cambió la codificación de glicina. En un esfuerzo para mejorar la expresión en la cabra, la región constante se cambió a una región constante de IgG1 que se clonó subsiguientemente. La región constante clonada a partir de p114 se utilizó para crear P137 y 138. p100 BC2083 heavy (BC2197) se cortó con ApaI-XhoI y 114 ZeroBlunt-IgG1 G1m(3) se cortó con ApaI y XhoI y se ligó para dar p138 (BC2228). La región constante clonada a partir de p121 (G1m(17)) se utilizó para crear p133, 134, 135 y 136 BC2083 heavy G1m(17). La región constante kappa también fue reemplazada por una clonada por GTC Biotherapeutics. SEQ. ID. NO. 1: AGGGTACCAAGCTTCAAATCAAACGAAC-Kappa constante humana H01; SEQ. ID. NO. 2: 5'AAGGGTCCGGATCCTCGAGGATCCTAACACTCTCCCTGTTGAAGCTC-humana Kappa C n°7734.

55 Producción de líneas de fibroblastos en la piel

60 Fibroblastos de muestras de biopsia de la piel de cabra recientes se mantuvieron en cultivo primario *in vitro*. En síntesis, las muestras de piel fueron picadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) exenta de Ca⁺⁺ y exenta de Mg⁺⁺, se recogieron con tripsina diluida en EDTA para recuperar suspensiones de una sola célula y se cultivaron a 37°C. Las células confluentes se trataron con tripsina y se sub-cultivaron. Partes alícuotas de células se crioconservaron en nitrógeno líquido para su uso futuro.

Análisis de líneas de células transfectadas

5 Células transfectadas se caracterizaron por análisis de transferencia Southern con sondas específicas para los transgenes, tales como beta-caseína, ADNcs de cadenas H y L anti-CD137 quiméricos, para establecer el número de copias del transgén e identificar re-ordenamientos potenciales. Cada una de las líneas de células se analizó también mediante FISH para confirmar la integración sencilla y para determinar la localización cromosómica. Se realizó un análisis citogenético para confirmar los cariotipos de las líneas de células.

10 *FISH*

15 Para la FISH en interfase, unos pocos cientos de células de cada una de las colonias expandidas se inmovilizaron sobre filtros y se hibridaron a sondas marcadas con digoxigenina específicas para el transgén amplificadas. Para la FISH en metafase, las células se cultivaron en portaobjetos para cámara Lab Tek (Nunc, Rochester, NY) y se pulsaron con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para permitir la unión por replicación. La unión de la sonda se detectó con anti-digoxigenina conjugada a FITC, y los cromosomas se contra-tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Zeiss Axioskop (Zeiss Imaging, Thornwood, NY), una cámara digital Hamamatsu (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) y el software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD). La mayoría de las sondas eran relativamente grandes y fáciles de detectar.

20 Sondas para las cadenas H y L de IgG individuales, que fueron codificadas por secuencias de ADNc relativamente cortas, eran demasiado pequeñas para dar una buena resolución por sí mismas. Estas pequeñas sondas fueron mezcladas con secuencias de promotor específico para la leche para la beta-caseína de cabra.

25 *Análisis citogenético*

Se llevó a cabo el análisis citogenético de líneas de células de fibroblastos transfectadas de donantes. Sondas de transgenes se marcaron con digoxigenina-dUTP por traslación de incisión. La unión de la sonda a los cromosomas desnaturalizados se detectó ya sea con anti-digoxigenina conjugada a FITC o con anti-digoxigenina conjugada a peroxidasa de rábano picante, seguido de tiramida conjugada a FITC. Patrones de bandas cromosómicas se visualizaron con DAPI. Las cabras tienen 60 cromosomas, todos ellos acrocéntricos (que tienen el centrómero en un extremo en lugar de en o cerca del centro). Los diferenciales de metafase se inspeccionaron en busca de evidencia de anomalías graves tales como la pérdida de cromosomas, la duplicación o la reordenación bruta. Líneas de células que se utilizaron para generar cabras transgénicas de primera generación eran cariotípicamente normales y portaban genes de las cadenas H y L de anti-CD 137 quiméricos estructuralmente intactos junto con el promotor de beta-caseína y otros elementos reguladores esenciales.

35

Generación de animales transgénicos que expresan anti-CD137 humano quimérico en la leche

40 Se han producido versiones glicosiladas y no glicosiladas de anticuerpos anti-CD137 humanos quiméricos. Después de la purificación de cantidades suficientes de anticuerpos de la leche para someter a ensayo la bioactividad, se encontró que a pesar de que se producían esencialmente en niveles idénticos, diferían los perfiles de actividad de las dos formas.

45 Se utilizaron construcciones transgénicas para los anticuerpos quiméricos para generar ratones y cabras transgénicos. Los animales transgénicos producen anticuerpos maduros mediante la introducción de una mezcla 1:1 de construcciones de cadena H y L. La construcción de la cadena L se combinó con la construcción de cadena H glicosilada o aglicosilada. Específicamente, los niveles relativos y absolutos de producto bioactivo en la leche se midieron por análisis de transferencia Western y la medición de la unión de anticuerpos *in vitro*.

50 *Ratones transgénicos*

Una estrategia práctica para someter a ensayo la viabilidad de los sistemas inducibles en ratones transgénicos era evaluar la expresión de proteínas transgénicas en la leche de ratones de primera generación (F₁). Se ha determinado que, en algunos animales transgénicos, las construcciones transgénicas originales se integran en sitios del cromosoma en las divisiones celulares después de la microinyección. Los animales fundadores son, por lo tanto, quiméricos que puede afectar a los niveles de expresión del transgén. Estos sitios de integración en el cromosoma se segregan en la siguiente generación para formar líneas de animales transgénicos homogéneas y estables. Por lo tanto, ratones F₁ son modelos razonables para determinar la estabilidad de la expresión transgénica y los productos biológicos que producen. Además de ello, a fin de que los ratones lacten, deben madurar (lo cual supone alrededor de 2 meses), aparearse y producir descendencia. Después del análisis se determinó que los niveles de secreción eran estables y la construcción utilizada era eficaz.

55

60

ADN lineal a partir de cada construcción preparada se purificó por gradiente de CsCl seguido de electroelución, y se generaron ratones transgénicos mediante microinyección pronuclear. Animales fundadores transgénicos se identificaron por análisis de PCR del ADN de tejido de la cola, y el número relativo de copias se determinó usando el análisis de transferencia Southern. Se produjo un cierto número de hembras “fundadoras” (F₀) portadoras de transgenes, de primera generación, para cada construcción (glicosilada y aglicosilada). Estos ratones F₀ se aparearon en la madurez para iniciar la lactancia. Su leche se analizó en transferencias Western desarrolladas con anticuerpo Fc anti-humano de cabra para identificar a ratones que secretan anticuerpos quiméricos estructuralmente intactos que portan la región C_H humana.

Los mejores fundadores, definidos como animales sanos con la máxima expresión razonable de anticuerpos en su leche, fueron criados después para generar hembras F1, que se utilizaron para proporcionar leche suficiente para ser recogida para el ensayo de anticuerpos *in vitro* e *in vivo*.

Cabras transgénicas

Cabras transgénicas con la genética predefinida se generaron utilizando técnicas de transferencia nuclear rutinarias en la técnica. La transferencia nuclear elimina el problema con el mosaicismo del transgén en las primeras pocas generaciones, ya que todos los animales que se derivan de una línea de células transgénica, deben ser completamente transgénicos. La construcción del transgen se introdujo en líneas de células primarias por un método de transfección estándar tal como lipofección o electroporación. Las líneas de células primarias recombinantes se rastrearon *in vitro* en cuanto a características importantes, tales como el número de copias del transgén, la integridad y el sitio de integración, antes de que se utilizaran para producir animales transgénicos. Fibroblastos de la piel de cabra hembra se utilizaron para hacer que las células transgénicas transfectadas sirvieran como donantes nucleares para la transferencia nuclear, resultando en una descendencia de todo hembras. La leche que contiene la proteína recombinante podría, por lo tanto, obtenerse directamente de cabras F₀. Los niveles relativos y absolutos de producto bioactivo en la leche se midió por análisis de transferencia Western.

Resultados

Purificación y Caracterización de Anticuerpos

Se generaron cuatro anticuerpos anti-CD137 quiméricos diferentes. Una variante era aglicosilada por mutación de Asn297 a una glutamina. Esta variante de anticuerpo puede funcionar como un control negativo en estudios funcionales, ya que se sabe que las IgGs aglicosiladas no se unen a receptores Fc o no activas en la ADCC (Nose et al., 1983). Otras dos variantes de anticuerpos se prepararon a partir de leche, una a partir de leche de ratón y una a partir de leche de cabra. La cuarta variante de anticuerpo se expresó en células HEK 293, una línea de células humana.

Una de las variantes de anticuerpo se expresó en células humanas. La línea de células 293 de riñón embrionario humano (293) es adecuada para la tecnología de transfección transitoria, ya que se puede transfectar de manera eficiente. Se utilizó una variante genética que expresa establemente la proteína EBNA1 de EBV (293E), que proporciona una expresión de la proteína significativamente mayor cuando oriP de EBV está presente en la cadena principal del vector.

La expresión incrementada obtenida en sistemas oriP/EBNA1 parece ser independiente de la replicación episomal cuando se realiza la transfección transitoria, ya que la separación del dominio DS de oriP, que es el responsable de la iniciación de la replicación del ADN en células EBNA1 positivas, no reduce la expresión del transgén, mientras que la separación de FR pero no DS reduce fuertemente la expresión. La expresión incrementada, por lo tanto, es debida, probablemente, al efecto combinado de la actividad del potenciador dependiente de EBNA1-oriP y a la importación nuclear mejorada de plásmidos, debido a la presencia de una señal de localización nuclear en EBNA1 (Pham et al., 2003).

pCEP4 (Cat n° V04450; Invitrogen, Carlsbad, CA), un vector diseñado para la expresión constitutiva de alto nivel a partir del promotor de CMV, fue utilizado para expresar el anticuerpo. El sistema hospedante vector de 293EBNA/ebv representa una mejora significativa sobre los sistemas basados en COS7/SV40ori (Jalanko et al., 1988; Shen et al., 1995). Una cuestión importante para la expresión de la proteína recombinante de alto nivel es el uso de vectores con promotores que son altamente activos en la línea de células hospedantes tales como el promotor de CMV, que es particularmente potente en las células 293, debido a que es transactivado por la proteína E1a de adenovirus expresada constitutivamente. (Durocher et al., 2002).

Un hibridoma (GW) que produce un anticuerpo monoclonal específico para CD137 humano se generó mediante la

fusión de las células B de bazo de un ratón BALB/c que había sido inmunizado con una proteína de fusión de la porción extracelular de CD137 humano y la región Fc de IgG2a de ratón a un plasmacitoma de ratón por métodos convencionales como se ha descrito previamente (Wilcox et al, 2002, J Clin Inv 109:651-659). Los anticuerpos anti-CD137 son versiones quiméricas de un anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón a CD137 humano, en que las regiones constantes han sido reemplazadas en la cadena pesada y en la cadena ligera de la región constante de la IgG1 humana y la región constante kappa humana, respectivamente. Este anticuerpo se expresó en la leche de ratón y de cabra usando un promotor de beta-caseína (Pollock et al, J Immunol Meth 231:147-157) o en células HEK 293 usando un promotor de citomegalovirus (CMV) por transfección transitoria. La leche de cabra procedía de lactancias inducidas hormonalmente de cabras transgénicas (Ebert et al, 1994, Biotech 12:699-702). Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de Proteína A. El anticuerpo de la leche de cabra se purificó después de 9 días de lactancia para evitar que el anticuerpo de cabra contaminara el calostro de ordeños anteriores. Preparados similares de anticuerpo anti-CD137 quimérico derivado de leche de cabra son 90% de monómero y 10% de agregados por cromatografía de exclusión por tamaño. Las concentraciones de anticuerpo se midieron mediante absorbancia a 280 nm, y utilizando el valor de 1,4 mg/ml, es 1 OD como el factor de conversión.

Análisis del Azúcar

Se liberaron oligosacáridos enlazados a asparagina utilizando PNGasa F a 37°C durante una noche en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, que contiene beta-mercaptoetanol al 1%. Las muestras se analizaron por análisis de desorción-ionización de láser asistida por matriz, tiempo de vuelo (MALDI-TOF) espectrometría de masas (MS) usando un puesto de trabajo Voyager DE-PRO Biospectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de MALDI-TOF MS se realizó con una matriz en ion positivo, modo reflexivo de ácido 2,5-dihidroxibenzoico/ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (9:1, v/v). El hidratao de carbono principal (63%) en el anticuerpo derivado de la leche de ratón es Man5 no fucosilado. La **Fig.1** muestra un análisis MALDI-TOF MS de N-glicanos que se liberaron a partir de los anticuerpos mediante digestión con PNGasa F. Comparando los resultados a partir del anticuerpo derivado de la leche de ratón con los resultados del anticuerpo derivado de cultivo de células, resulta claro que el oligosacárido principal del anticuerpo derivado de la leche de ratón es Man5, que contiene 5 residuos de manosa y 2 residuos GlcNAc.

El análisis de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) se realizó en oligosacáridos marcados con ácido 2-aminobenzoico liberados mediante PNGasa F después de la digestión durante una noche a 37°C. Ochenta microgramos de anticuerpo fueron tratados con PNGFasa durante una noche a 37°C. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 10 kDa y luego se dializaron frente a agua durante una noche en un aparato Biodialyzer. La muestra se secó, se marcó con ácido 2-aminobenzoico y se limpió para separar marcador en exceso. Después de evaporación a sequedad, la muestra se reconstituyó con 500 µl de agua y 100 µl se inyectaron en una columna Asahipak NH2P-50 4D (4,6 x 250 mm, Phenomenex) utilizando un sistema HP1100 equipado con un detector de fluorescencia (230 nm en excitación y 425 nm en emisión), de acuerdo con un método descrito por Anumula et al. (Cammusco et al., 2000, Anim Biotech 11; 1-17). Patrones de Man5 y Man6 fueron adquiridos de Prozyme. La cuantificación se realizó mediante análisis de HPLC y se muestra en la **Fig. 2**, confirmando que las especies del anticuerpo derivado de la leche de ratón, que funciona de forma idéntica a Man5 convencional, es un oligonucleótido de manosa era la demostración de su sensibilidad a Endo H (Maley et al., 1981 y Tarantino et al., 1974). Después del tratamiento con Endo H, el pico de Man5 desaparece, lo que confirma la identidad del pico visto a los 36,5 minutos en la muestra derivada de leche de ratón de anticuerpo (**Figs. 2 y 3**). Hay especies secundarias presentes tales como G1F que contiene núcleo de fucosa (16%) y G2F (21%), así como cantidades menores de G1 no fucosilado y Man6. IgG de pollo, que contiene estructuras de oligomanosa, tiene especies en 2068 y 1906, correspondientes a Man8 y Glc1Man8 (Raju et al.). Aunque Man6 es detectable en 1420, faltan claramente oligosacáridos con mayor contenido en manosa en 1582, 1744 y 1906. En contraposición, las principales especies presentes en el material derivado de células HEK 293 son G0F fucosilado (55%) y G1F (37%), siendo G2F una especie secundaria (8%). Se sabe que las células HEK 293 son proteínas ineficazmente sialiladas producidas a altas concentraciones (Chitlaru et al, 2002; Chitlaru et al, 1998).

Tanto la **Fig. 1** (datos de MS) como la **Fig. 2** demuestran que las composiciones de hidratos de carbono de anticuerpos derivados de la leche como de anticuerpos derivada de cultivo de células son significativamente diferentes. La **Fig. 2** es una comparación de mapas de oligosacáridos obtenidos mediante HPLC con detección de fluorescencia y muestra que el hidrato de carbono principal (63%) en el anticuerpo derivado de la leche de ratón es Man5 no fucosilado, mientras que los hidratos de carbono principales de anticuerpo derivado de cultivo de células están fucosilados. El anticuerpo aglicosilado no dio picos algunos. Los datos de HPLC indican que los oligosacáridos principales en anticuerpos derivados de la leche son oligomanosa, mientras que el anticuerpo derivado del cultivo de células carece de oligomanosa.

Concanavalina A (Con A) es una lectina que se une a los residuos manosilo terminales (Goldstein et al, 1965a,

Biochim Biophys Acta; Goldstein et al, 1965b Biochem). De acuerdo con los hallazgos de los autores de la invención de que el anticuerpo derivado de la leche tenía oligomanosa, está ligado a concaivalina A y se eluyó con alfa-metilmanósido (**Fig. 4**). Las especies principales en el material derivado del cultivo celular es G0F, que tiene residuos GlcNAc terminales, no se esperaba que se unieran a concaivalina A. La **Fig. 4** muestra que el anticuerpo derivado de la leche transgénica contiene oligomanosa. En contraposición, el anticuerpo aglicosilado utilizado no se une en el mismo experimento.

Las especies principales presentes en material derivado de células HEK 293 son G0F fucosilado (55%) y G1F (37%), con G2F como una especie secundaria (8%). Esto significa que el anticuerpo derivado de cultivo de células está completamente fucosilado. El anticuerpo derivado de cultivo de células carece de modificación con ácido siálico, ya que se sabe que células HEK 293 sialilan de manera ineficaz proteínas producidas en altas concentraciones (Chitlaru et al., 2002, Biochem J 363, 619-631).

En contraposición con la gran mayoría de la glicosilación que está fucosilada en el anticuerpo derivado de cultivo de células, el hidrato de carbono principal (63%) en el anticuerpo derivado de la leche del ratón es Man5 no fucosilado. Las especies principales del anticuerpo derivado de la leche de ratón actúan de forma idéntica a Man5 estándar. G1F actúa próximo a Man5 en el análisis por HPLC, pero la confirmación de que el pico es un oligosacárido manosa, fue la demostración de su sensibilidad a Endo H (Maley et al., 1981, J. Biol. Chem. 256:1088-1090). Después del tratamiento con Endo H desaparece el pico visto a los 36,5 minutos en la muestra de anticuerpo derivada de la leche de ratón (**Fig. 2D**). Existen especies secundarias presentes tales como como G1F que contiene fucosa en el núcleo (16%) y G2F (21%), así como cantidades menores de G1 no fucosilado y Man6. El análisis MALDI-TOF de los azúcares en el material derivado de la leche de cabra reveló una distribución más amplia de azúcares que contienen manosa que el encontrado en el material derivado de la leche de ratón, de la forma más notable la presencia de Man7 y Man8 que indica una deficiencia en el procesamiento de manosidasas. Esto hace más difícil la cuantificación del análisis por HPLC, ya que los azúcares no fucosilados se dispersaron a lo largo de una gama más amplia. El análisis por HPLC demostró la presencia de muchos picos sensibles a EndoH que representan el 10-20% de los azúcares totales (**Fig. 2**).

Análisis de citometría de flujo

La unión de las diferentes formas de los anticuerpos quiméricos se evaluó mediante análisis FACS. 2×10^5 células se incubaron con el anticuerpo a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS de FBS al 5%. El anticuerpo se detectó con Fc anti-humano de cabra marcado con FITC diluido 1:100 (Jackson Immuno Research Labs) y se analizó mediante un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson). Los datos presentados en la **Fig. 5** demuestran que todos los anticuerpos estudiados tenían una similitud de los antígenos, independientemente de la fuente. Los controles de los anticuerpos anti-DNP no se unían, como era de esperar.

Resonancia de plasmón superficial

La cinética de la interacción de IgG1 con CD16a se midió por resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore 2000 y chips sensores CM5 (BIAcore, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos anti-HPC4 se inmovilizaron en el chip usando condiciones de acoplamiento NHS/EDC. El anticuerpo estaba a una concentración de 20-50 $\mu\text{g/ml}$ a pH 5,0 para dar un chip con 11.000 RU. CD16a-HPC4 fue capturado a esta superficie del anticuerpo con una inyección durante 3 min de 30 $\mu\text{g/ml}$ de proteína con un caudal de 5 $\mu\text{l/min}$ en tampón Hepes 10 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,15 M y tensioactivo P20 al 0,005% (v/v) (tampón HBS-P, BIAcore AB) con la adición de CaCl_2 1 mM. Anticuerpos de ensayo se diluyeron a continuación en el tampón de unión anterior hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ y se inyectaron en el CD16a capturado durante un minuto a un caudal de 20 $\mu\text{l/min}$. La disociación se controló durante 3 min. A continuación, la superficie se regeneró con una inyección durante 3 min de EDTA 5 mM preparada en tampón HBS-P, antes del siguiente ciclo de captura-unión-regeneración. La **Fig.13** muestra que anticuerpos derivados de la leche tienen una unión más fuerte que los anticuerpos derivados de cultivo de células. Se determinó a continuación si esta actividad de ADCC incrementada se reflejó en una afinidad incrementada por el receptor de células NK, CD16. Mediciones de resonancia de plasmón superficial se utilizaron para medir la unión de los diversos anticuerpos a CD16 inmovilizado. Los anticuerpos derivados de la leche se unían mejor que el anticuerpo de cultivo de células (**Fig. 13**).

Ensayos celulares

Células de carcinoma renal humanas 786-O y células de riñón embrionario (HEK) 293 fueron adquiridas de ATCC. 786-O son células epiteliales adherentes de un adenocarcinoma de células renales (Williams et al, 1978, *In vitro* 14:779-786). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM ajustado para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 4,5 g/L de glucosa, HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1,0 mM, 90%, suero de bovino fetal (FBS), 10%.

Las células CHO se transfectaron con un vector pCEP4 que expresa la secuencia codificadora de CD137. Los clones se aislaron por selección con higromicina, se rastrearon mediante FACS para la expresión en la superficie celular, y se utilizó un clon.

5

Ensayo de ADCC

Con el fin de someter a ensayo las actividades de ADCC relativas de anticuerpos derivados de la leche y derivados del cultivo de células, se preparó el mismo anticuerpo a partir de diferentes fuentes. Se prepararon cuatro diferentes formas de un anticuerpo anti-CD137 quimérico. Una forma era aglicosilada por la mutación de Asn297 a una glutamina. Esto servía como un control negativo, ya que IgGs aglicosiladas son conocidas por no unirse a receptores Fc ni para ser activas en la ADCC (Nose et al, 1983, PNAS 80:6632:6636). Otras dos formas de anticuerpos se prepararon a partir de leche, uno a partir de leche de ratón y el otro a partir de leche de cabra. La cuarta forma era de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria, una línea de células humana.

15

Se recogieron células 786-O utilizando Versene 1:50 (Invitrogen) y se resuspendieron en medio de crecimiento y se marcaron con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (1 $\mu\text{C}/\mu\text{l}$) durante 1,5 horas, después de lo cual las células se lavaron tres veces con RPMI. Las células efectoras eran células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC – siglas en inglés), preparadas como se describe anteriormente por van Epps et al. (Van Epps et al., 1999, J Virol 73: 5301-5308). Se utilizó una relación efector:diana de 200:1, ya que la viabilidad de PBMC es sólo de 40-60% después de la descongelación. Las células fueron co-incubadas durante 12 horas a 37°C y luego se transfirieron 25 μl de sobrenadante para el recuento. La liberación espontánea se determinó incubando células diana con un volumen igual de medios con el anticuerpo (sin PBMCs). La radiactividad total se determinó incubando células diana con un volumen igual de medio que contenía Triton-X100 al 1% (Sigma). El porcentaje de lisis específica se calculó como sigue: $[\text{E-S}]/(\text{T-S}) \times 100$, en donde T es la radiactividad total, E es la liberación experimental y S es la liberación espontánea que era $19 \pm 3\%$.

20

25

Con el fin de someter a ensayo la actividad de ADCC de estos preparados, se identificó una línea de células tumorales que expresa CD137. 786-O es una línea de células de carcinoma de células renales que expresa cantidades bajas de CD137 y, al parecer, HER2. Se utilizó FACS para comparar la unión de las diferentes formas de anticuerpos anti-CD137 quiméricos. Mediante este criterio, todos los anticuerpos se unen de manera idéntica (**Fig. 5**). Sin embargo, cuando se midieron las actividades en el ensayo de ADCC, las eficacias de los anticuerpos son totalmente diferentes. Las dos proteínas derivadas de la leche eran activas, mientras que el material de cultivo de células no tiene actividad alguna, aunque se unía igual de bien (**Fig. 6**). La ausencia de citotoxicidad sin células (es decir, liberación espontánea) demuestra que los propios anticuerpos no están matando. En la **Fig. 6** se demuestra que las moléculas producidas en la leche de animales transgénicos tienen actividad de ADCC mejorada. Esta característica eleva la capacidad de anticuerpos derivados de la leche transgénicos de asesinar células diana - tales como células tumorales. Los controles utilizados eran anticuerpos anti-DNP que no deberían unirse a células diana y anti-CD137 aglicosilado que no debería unirse al receptor Fc.

30

35

40

También se ensayó la actividad de ADCC de estas diversas preparaciones de células CHO transfectadas con un vector de expresión para CD 137. Una vez más, todos los preparados de anticuerpo se unen de forma idéntica a las células transfectadas (**Fig. 11**). Los anticuerpos derivados de la leche tuvieron dos veces más actividad que el anticuerpo derivado del cultivo de células (**Fig. 12**).

45

La actividad de ADCC mejorada se debe, en algunas realizaciones, a la falta de fucosa en la glicosilación de la región constante de la cadena pesada. En la leche de ratón, en lugar de fucosa, la glicosilación es sobre todo un precursor, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Sin embargo, ha tenido lugar algún procesamiento ya que no están presentes especies de manosa superiores. El anticuerpo derivado de la leche Man_6 es detectable a 1420 (**Fig. 1**), mientras que oligosacáridos con alto contenido en manosa están claramente ausentes a 1582 (Man_7), 1744 (Man_8) y 1906 (Man_9), lo que indica que se produce algún procesamiento mediado por manosidasa I.

50

N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT-I) es la enzima clave que conduce a susceptibilidad de alfa-manosidasa II de Golgi de la cadena de hidratos de carbono en desarrollo. Esta enzima es aparentemente funcionalmente limitante en la glándula mamaria del ratón, ya que el bloque de glicosilación conduce a la acumulación de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Li et al, 1978, J Biol Chem 253:6426-6431). Esta acumulación también podría ser el resultado de que el anticuerpo no pasara suficiente tiempo en el compartimento de Golgi mediano, en donde se localiza esta enzima. La incapacidad de transferir GlcNAc a esta cadena impide su escisión por alfa-manosidasa II de Golgi que permitiría su posterior procesamiento por N-acetilglucosaminil-transferasa II (GnT-II) y galactosiltransferasa. La 1,6-fucosa se añade después de la modificación de GnT-II, lo que explica por qué las estructuras de oligomanosa no están fucosiladas (Longmore et al, 1982, carbohy Res. 100:365-392). Esta forma glicosilada de oligomanosa de IgG se ha hecho previamente en células Lec1, células CHO deficientes en la actividad de N-

55

60

acetilglucosaminiltransferasa I (Wright et al, 1994, J Exp Med 180:1087-1096). Se encontró que era defectuosa en la hemólisis mediada por el complemento y la unión a FcRI. Una sustancialmente más C3 de la vía alternativa para la activación del complemento que otros anticuerpos (Wright et al, J Immunol 160:3393-3402).

5 El anticuerpo derivado de la leche de cabra muestra una glicosilación más heterogénea. A pesar de que la mayor parte del material es G1F procesada y G2F, los oligosacáridos que contienen manosa oscilan desde Man5 a Man8 (Fig. 1).

10 Bajos niveles de agotamiento de fucosa conducen a grandes efectos en la mejora de ADCC. Las cadenas pesadas en anticuerpos son dímeros. Si la glicosilación de las cadenas pesadas era todo o nada, los anticuerpos serían o bien todos tienen oligomanosa en las dos cadenas pesadas o han procesado manosa, Man3GlcNAc2, en las dos cadenas pesadas; no habría dímeros mixtos. El alto nivel de ADCC sugiere que las cadenas están glicosiladas de forma independiente y que sólo una cadena tiene que ser deficiente en fucosa para una actividad mejorada. Las cadenas de anticuerpo se multimerizan en el retículo endoplasmático, mientras que la glicosilación se completa en el aparato de Golgi. Con la glicosilación independiente de las cadenas pesadas y 20% de las cadenas con alto contenido en manosa, sólo el 4% de las moléculas de anticuerpo tendría las dos cadenas con oligomanosa y el 64% con las dos cadenas que contienen manosa procesada, mientras que el 32% restante estaría compuesto de una cadena con oligomanosa y la otra cadena de manosa procesada. Esto daría un total de 36% de las moléculas de anticuerpo que tienen al menos una cadena de oligomanosa. Por lo tanto, parece que una sola cadena pesada que carece de fucosa es suficiente para mejorar la ADCC. Esto es razonable, teniendo en cuenta la unión asimétrica del receptor de Fc a la molécula de inmunoglobulina, en donde la región D1 se une a una cadena y la región D2 se une a la otra cadena, aproximadamente (Radaev et al, 2002, Mol Immun 38:1073-1083). Por lo tanto, la fucosilación sólo afecta la unión a un dominio y esto es suficiente para aumentar la afinidad. Se observó un aumento similar en la ADCC en un estudio previo en un caso en el que el anticuerpo fucosilado contenía 91% de fucosa y el anticuerpo agotado en fucosa contenía 72% de fucosa (Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473).

30 Era sorprendente que el experimento funcionara tan bien en las células con una densidad tan baja de antígeno. Se ha demostrado que la separación de fucosa a partir de IgG1 podría reducir la cantidad de antígeno necesaria para la actividad de ADCC como resultado de la activación eficaz de células NK. Este efecto probablemente explica los excelentes resultados obtenidos con una línea de células que expresa deficientemente CD137.

35 Anticuerpo producido en la leche de ratón tenía más actividad a concentraciones más altas que el anticuerpo de leche de cabra. La preparación de anticuerpos de la leche de cabra puede contener 10% de agregados, que pueden unirse a las PBMCs directamente sin unión a células diana. Esta unión no productiva podría bloquear la actividad de las PBMCs (Kipps et al, 1985, J Exp Med 161:1-17).

40 Por lo tanto, se ha encontrado que la leche transgénica es una buena fuente de anticuerpos mejoradas para la actividad de ADCC. Se informó que el anticuerpo producido en células de insectos era más eficaz que el mismo anticuerpo producido en células de mamífero (Lang et al., 2004). Se han intentado otros sistemas, pero no han demostrado tener tanto éxito. Anticuerpo producido en *Aspergillus niger* no había aumentado la actividad de ADCC, posiblemente porque era una mezcla de anticuerpos aglicosilados y glicosilados (Ward et al., 2004). Se informó de que el anticuerpo quimérico producido en levaduras tenía la misma actividad ADCC que el derivado en el cultivo de células (Horwitz et al., 1988). La activación de FcγIIIb también conduce a la secreción de citoquinas.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo que contiene fucosa puede ser separado del anticuerpo no fucosilado haciendo pasar la mezcla de anticuerpos sobre una columna de lectina.

50 Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen parte de la memoria descriptiva, ilustran las realizaciones de la invención, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Referencias

- 55 1. Anolik, J. H., et al., (2003) ARTHRITIS RHEUM 48, 455-459.
2. Anumula, K. R., y Dhume, S. T. (1998) GLYCOBIOLOGY 8, 685-694.
- 60 3. Axford, J. S., N. Sumar, et al. (1992), Changes In Normal Glycosylation Mechanisms In Autoimmune Rheumatic Disease, J. CLIN INVEST 99(3):1021-31.
4. Baguisi A, et al. (1999), *Production of Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer*, NATURE BIOTECH, 17: 456-461.

5. Cammuso, C., et al., (2000) ANIM BIOTECHNOL 11, 1-17.
6. Canfield, S. M. y S. L. Morrison (1991) *The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region*, J. Exp. MED. 173(6): 1483-91.
7. Cartron, G., et al., (2002) BLOOD 99, 754-758.
8. Chen, S.H., et al. (2000), *Rejection of Disseminated Metastases of Colon Carcinoma by Synergism of IL-12 Gene Therapy And 4-1BB Costimulation*, MOL. THER., 2:39-46.
9. Chitlaru, T., et al., (2002) BIOCHEM J 363: 619-31.
10. Chitlaru, T., et al., (1998) BIOCHEM J 336: 647-58.
11. Chiu M.H. et al. (1994), *In Vivo Targeting Function of N-Linked Oligosaccharides with Terminating Galactose and N-Acetylgalactosamine Residues*, J. BIOL. CHEM., 269 (23):16195-202).
12. Clynes, R.A., et al., (2000) NAT MED 6, 443-46.
13. Clynes, R.A., et al., (1998) PROC NATL ACAD Sci USA 95, 652-56.
14. Dall'Ozzo, S., et al., (2004) CANCER RES 64, 4664-69.
15. Denman, J., et al., (1991) BIOTECHNOLOGY (N Y) 9, 839-43.
16. Dorai, H., B. M. Mueller, et al. (1991), *Aglycosylated Chimeric mouse/human IgG1 Antibody Retains Some Effector Function*, HYBRIDOMA 10(2): 211-17.
17. Ebert, K. M., et al., (1994) BIOTECHNOLOGY (NY) 12, 699-702.
18. Edmunds, T., et al., (1998) BLOOD 91, 4561-71.
19. Foell, J. et al. (2003), *CD137 Co-Stimulatory T cell Receptor Engagement Reverses Acute Disease in Lupus-Prone NZB x NZW F1 mice*, J. CLIN.INVEST. 111 (10), 1505-1518.
20. Fuji, S., T. Nishiura, et al. (1990), *Structural Heterogeneity of Sugar Chains in Immunoglobulin G. Conformation of Immunoglobulin G Molecule and Substrate Specificities of Glycosyltransferases*, J. BIOL. CHEM. 265(11): 6009-18.
21. Goldstein, I. J., et al., (1965) BIOCHIM BIOPHYS ACTA 97, 68-76.
22. Goldstein, I. J., et al., (1965) BIOCHEMISTRY 4, 876-83.
23. Gottlieb, C., et al., (1975) J BIOL CHEM 250,3303-3309.
24. Gruel, Y., et al., (2004) BLOOD 10, 10.
25. Guinn, B.A. et al. (1999), *4-1BB Cooperates With B7-1 And B7-2 In Converting A B Cell Lymphoma Cell Line Into A Long-Lasting Antitumor Vaccine*, J. IMMUNOL. 162:5003-5010.
26. Harpaz, N., y Schachter, H. (1980) J BIOLCHEM 255, 4885-4893.
27. Hong, H. J., J. W. Lee, et al. (2000), *A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in non-human primates*, J. IMMUNOTHER. 23 (6): 613-21.
28. Horwitz, A. H., et al., (1988) PROC NATL ACAD SCI USA 85, 8678-82.
29. Jalanko, A., A. Kallio, et al. (1988), *An EBV-based mammalian cell expression vector for efficient expression of cloned coding sequences*, BIOCHIM BIOPHYS ACTA 949(2): 206-12.
30. James, D. C., et al., (1995) BIOTECHNOLOGY (N Y) 13, 592-596.

31. Jefferis, R., J. Lund, et al. (1995), *Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation*, IMMUNOL LETT 44(2-3): 111-17.
- 5 32. Kasinathan P. et al. (2001), *Production of Calves from G1 Fibroblasts*, NATURE BIOTECH, 19: 1176-78.
33. Kerr, D.E., y Wellnitz, O., *Mammary Expression of New Genes to Combat Mastitis*, J. ANIM. SCI. 2003. 81:38-47 (2003).
- 10 34. Kim et al. (2001), *Divergent Effects of 4-1BB Antibodies on Antitumor Immunity and on TumorReactive T-Cell Generation*, CANCER RESEARCH 61: 2031-2037.
- 15 35. Kim, J. K., M. F. Tsen, et al. (1994), *Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for- persistence of IgG1 in the circulation of mice*, SCAND. J. IMMUNOL. 40(4): 457-65.
36. Kipps, T. J., et al., (1985) J EXP MED 161, 1-17.
- 20 37. Knight, D. M., C. Wagner, et al. (1995), *The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions*, MOL. IMMUNOL 32(16): 1271-81.
38. Koene, H. R., et al., (1997) BLOOD 90, 1109-14.
- 25 39. Lang, P., et al., (2004) BLOOD 103, 3982-85.
40. Leatherbarrow, R. J., T. W. Rademacher, et al. (1985) *Effector Functions of a Monoclonal Aglycosylated Mouse Igg2a: Binding and Activation of Complement Component C1 and Interaction with Human Monocyte Fc Receptor*, MOL. IMMUNOL. 22(4): 407-15.
- 30 41. Li, Q., et al. (2003), *Polarization Effects of 4-1BB during CD28 Costimulation in Generating Tumor-reactive T Cells for Cancer Immunotherapy*, CANCER RESEARCH 63(10): 2546-52.
- 35 42. Li, E., y Kornfeld, S. (1978) J BIOL CHEM 253, 6426-31.
43. Lively, M.R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M.J. y Phillips, J, (1995) GLYCOBIOLOGY 5, 813-822.
- 40 44. LoBuglio, A. F., R. H. Wheeler, et al. (1989), *Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response*, PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A 86(11): 4220-24.
45. Louis, E., et al., (2004) ALIMENT PHARMACOL THER 19, 511-19.
46. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1993), *Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs*, MOL. IMMUNOL. 30(8): 741-8.
- 50 47. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1996), *Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains*, J. IMMUNOL. 157(11): 4963-9.
48. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1995), *Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors*, FASEB. J. 9(1): 115-9.
- 55 49. Malaise, M. G., C. Hoyoux, et al. (1990), *Evidence for a role of accessible galactosyl or mannosyl residues of Fc domain in the in vivo clearance of IgG antibody-coated autologous erythrocytes in the rat*, CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 54(3): 469-83.
- 60 50. Maley, F., y Trimble, R. B. (1981) J BIOL CHEM 256, 1088-1090.
51. Malhotra, R., M. R. Wormald, et al. (1995), *Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein*, NAT. MED. 1(3): 237-43.

52. Martinet, O., et al. (2000), *Immunomodulatory gene therapy with interleukin-12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model*, J. NATL. CANCER Inst. 92:931-936.
- 5 53. Maynard, J. and G. Georgiou (2000), *Antibody engineering*, ANNUAL REV. BIOMED. Eng 2: 339-76.
54. Melero, I., et al. (1997), *Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors*, NAT. MED. 3:682-685. BMS.
- 10 55. Melero, I., et al. (1998), *Amplification of tumor immunity by gene transfer of the costimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway*, EUR. J. IMMUNOL. 28:11116-1121.
56. Mimura, Y., P. Sondermann, et al. (2001), *Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding*, J. BIOL. CHEM. 276(49): 45539-47.
- 15 57. Miller et al. (2002), *4-1BB-Specific Monoclonal Antibody Promotes the Generation of Tumor-Specific Immune Responses by Direct Activation of CD8 T Cells in a CD40-Dependent Manner*, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 169: 1792-1800. Immunex.
- 20 58. Mittler, R.S., et al. (1999), *Anti-4-1BB Monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell energy*, J. EXP. MED. 190:1535.
59. Mizuochi, T., T. Taniguchi, et al. (1982), *Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G*, J. IMMUNOL. 129(5): 2016-20.
- 25 60. Mori, K., et al., (2004) BIOTECHNOL BIOENG 28, 28.
61. Niwa, R., et al., (2004) CANCER RES 64, 2127-2133.
- 30 62. Niwa, R., et al., (2005) CLIN CANCER RES 11, 2327-2336:
63. Niwa, R., et al., (2004) CLIN CANCER RES 10, 6248-6255.
64. Nose, M., y Wigzell H. (1983), *Biological Significance of Carbohydrate Chains on Monoclonal Antibodies*, PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A 80(21): 6632-36.
- 35 65. Okazaki, A., et al., (2004) J MOL BIOL 336, 1239-1249.
66. Pham, P. L., S. Perret, et al. (2003), *Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency*, BIOTECHNOL BIOENG 84(3): 332-42.
- 40 67. Pollock, D. P., et al., (1999) J IMMUNOL METHODS 231, 147-157.
- 45 68. Rademacher, T. W. (1993), *Glycosylation as a Factor Affecting Product Consistency*, BIOLOGICALS 21(2): 103-4.
69. Rademacher, T. W., S. W. Homans, et al. (1986), *Immunoglobulin G as a glycoprotein*, BIOCHEM SOC SYMP 51: 131-48.
- 50 70. Rademacher, T. W., R. B. Parekh, et al. (1988), *The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*, SPRINGER SEMIN IMMUNOPATHOL 10(2-3): 231-49.
71. Raju, T. S., et al., (2000) GLYCOBIOLOGY 10, 477-486.
- 55 72. Rothman, R. J., et al., (1989) MOL IMMUNOL. 26, 1113-23.
73. Rudd, P. M., R. J. Leatherbarrow, et al. (1991), *Diversification of the IgG molecule by oligosaccharides*, MOL. IMMUNOL. 28(12): 1369-78.
- 60 74. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (16^a ed., Osol, A., compilador, Mack, Easton Press. (1980)).

75. Sacchi, S., M. Federico, et al. (2001), *Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 Monoclonal antibody Rituximab*, CRIT. REV. ONCOL. HEMATOL. 37(1): 13-25.
- 5 76. Sambrook et al. (1989), *MOLECULAR CLONING-A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2ª Edición).
77. Shen, E. S., G. M. Cooke, et al. (1995), *Improved expression cloning using reporter genes and Epstein-Barr virus ori-containing vectors*, GENE 156 (2): 235-9.
- 10 78. Shields, R L., et al., (2002) J BIOL CHEM 277, 26733-26740.
79. Shinkawa, T., et al., (2002) J BIOL CHEM 8, 8.
80. Simmons, L. C., D. Reilly, et al. (2002), *Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and deficient production of aglycosylated antibodies*, J. IMMUNOL. METHODS 263(1-2): 133-47.
- 15 81. Stanley, P. (1984), *Glycosylation Mutants of Animal Cells*, ANNUAL REV. GENET. 18: 525-52.
82. Stanley, P., et al., (1975) PROC NATL ACAD SCI U S A 72, 3323-27.
- 20 83. Strome S.E. et al. (2002), *Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response*, CANCER RESEARCH 62:1884-89.
84. Sumar, N., K. B. Bodman, et al. (1990), *Analysis of glycosylation changes in IgG using lectins*, J. IMMUNOL. METHODS 131(1): 127-36.
- 25 85. Sutton, B. J. y D. C. Phillips (1983), *The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G*, BIOCHEM SOC TRANS 11 (Pt 2): 130-2.
86. Sun, Y. et al. (2002), *Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease*, NAT MED. 8(12), 1405-13.
- 30 87. Sun, Y. et al. (2002), *Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis*, J. IMMUNOL. 168(3), 1457-65.
- 35 88. Takeuchi, T., et al., (1999) AUTOIMMUNITY 31, 265-271.
89. Tamamori, Y., et al., (2002) INT J ONCOL 21, 649-654.
- 40 90. Tandai, M., T. Endo, et al. (1991), *Structural study of the sugar moieties of monoclonal antibodies secreted by human-mouse hybridoma*, ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.291(2): 339-48.
91. Tao, M. H. and S. L. Morrison (1989), *Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region*, J. IMMUNOL. 143(8): 2595-601.
- 45 92. Tao, M. H., R. I. Smith, et al. (1993), *Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation*, J. EXP. MED. 178(2): 661-67.
- 50 93. Tarentino, A. L., et al., (1974) J BIOL CHEM 249, 818-24.
94. Treon, S. P., et al., (2005) J CLIN ONCOL 23, 474-81.
- 55 95. Tsuchiya, N., T. et al. (1989), *Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG*, J. RHEUMATOL. 16(3): 285-90.
- 60 96. Van Epps, H. L., Schmaljohn, C. S., y Ennis, F. A. (1999) J VIROL 73, 5301-5308.

97. Walker, M. R., J. Lund, et al. (1989), *Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors*, BIOCHEM J. 259(2): 347-53.
- 5 98. Ward, M., et al., (2004) APPL ENVIRON MICROBIOL 70, 2567-76.
99. White, K. D., M. B. Frank, et al. (1996), *Effect of immunoglobulin variable region structure on C3b and C4b deposition*, MOL. IMMUNOL. 33(9): 759-68.
- 10 100. Wilcox R.A., et al. (2002), *Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors*, J. CLIN. INVEST. 109:651-59.
101. Wilcox R.A. et al. (2002), *Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T lymphocytes and responsiveness to interleukin-2*, J. IMMUNOL. 169: 4230-36.
- 15 102. Williams, R. D., et al., (1978) IN VITRO 14, 779-786.
103. Wilmut I, et al. (oct 10, 2002), *Somatic Cell Nuclear Transfer*, NATURE 419(6907):583-86.
- 20 104. Wilmut I, et al. (Feb 27, 1997), *Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells*, NATURE 385(6619):810-3.
105. Wolff, E. A., et al., (1993) CANCER RES 53, 2560-65.
- 25 106. Wright, A. y S. L. Morrison (1994), *Effect of altered CH2-associated Carbohydrate Structure On The Functional Properties And In Vivo Fate Of Chimeric Mouse-Human Immunoglobulin G1*, J. EXP. MED. 180(3): 1087-96.
107. Wright, A., y Morrison, S. L. (1998) J IMMUNOL 160, 3393-3402.
- 30 108. Wu, J., et al., (1997) J CLIN INVEST 100, 1059-1070.
109. Yamane-Ohnuki, N., et al., (2004) BIOTECHNOL. BIOENG. 87, 614-22.
- 35 110. Zhou, Q., et al., (2005) J. BIOTECHNOL. 117, 57-72.
111. Zhu G., et al. (2001), *Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/I-E β transgenic mice*, J. IMMUNOL. 167:2671-6.
- 40 112. Zou X, et al. (2002), *Generation of Cloned Goats (Capra Hircus) from Transfected Foetal Fibroblast Cells, the Effect of Donor Cell Cycle*, MOL REPROD DEV.; 61: 164-172. Chen et al., 20050013811.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GTC Biotherapeutics Inc.
 <120> Anticuerpos con actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mejorada, métodos para su
 5 producción y uso
 <130> PC780656EPA
 <150> US 60/729,054
 < 151> 21-10-2005
 <150> PCT/US2006/041656
 10 < 151> 23-10-2006
 <150> EP06844220.1
 < 151> 23-10-2006
 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.3
 15 <210> 1
 < 211> 28
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 20 < 223> oligonucleótido sintético
 <400> 1
 agggtagcaaa gcttgaatc aaacgaac 28
 <210> 2
 < 211> 48
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> oligonucleótido sintético
 <400> 2
 30 aagggtcgg atcctcgagg atcctaacac tctcccctgt tgaagctc 48

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de células epiteliales mamarias de mamíferos no humanos para mejorar la unión de la región Fc de un anticuerpo IgG o anticuerpos IgG a un receptor FcγRIII en comparación con un anticuerpo o anticuerpos derivados de un cultivo de células, en donde dichas células son de un mamífero no humano tratado mediante ingeniería genética para expresar el anticuerpo en su leche, y en donde el modelo de glicosilación del anticuerpo se modifica produciendo el anticuerpo o los anticuerpos en las células.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o anticuerpos son del isotipo IgG1 o IgG2.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo está modificado de manera que al menos una cadena del anticuerpo no contiene fucosa.
- 15 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo está modificado de manera que el anticuerpo contiene una oligomanosa o una oligomanosa adicional.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo está modificado de manera que los hidratos de carbono del anticuerpo exhiben un modelo de glicosilación con alto contenido en manosa.
- 20 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo está modificado de manera que al menos una cadena del anticuerpo contiene oligomanosa y no está fucosilada.
- 25 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo está modificado de manera que el hidrato de carbono principal del anticuerpo no está fucosilado. y es preferiblemente una oligomanosa no fucosilada, más preferiblemente Man5 no fucosilada.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo está modificado de manera que menos del 40% de los hidratos de carbono del anticuerpo contienen fucosa.
- 30 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los anticuerpos están modificados de manera que al menos el 30% de los anticuerpos tienen al menos una oligomanosa.
- 35 10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde al menos el 60% de los hidratos de carbono de los anticuerpos son una oligomanosa no fucosilada y menos del 40% de los hidratos de carbono de los anticuerpos contienen fucosa.
- 40 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde las células epiteliales mamarias son células procedentes de cabra, oveja, bisonte, camello, vaca, cerdo, conejo, búfalo, caballo, rata, ratón o llama.
- 45 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano o un fragmento de anticuerpo.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa que comprende preferiblemente una cadena pesada y una cadena ligera.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD137.

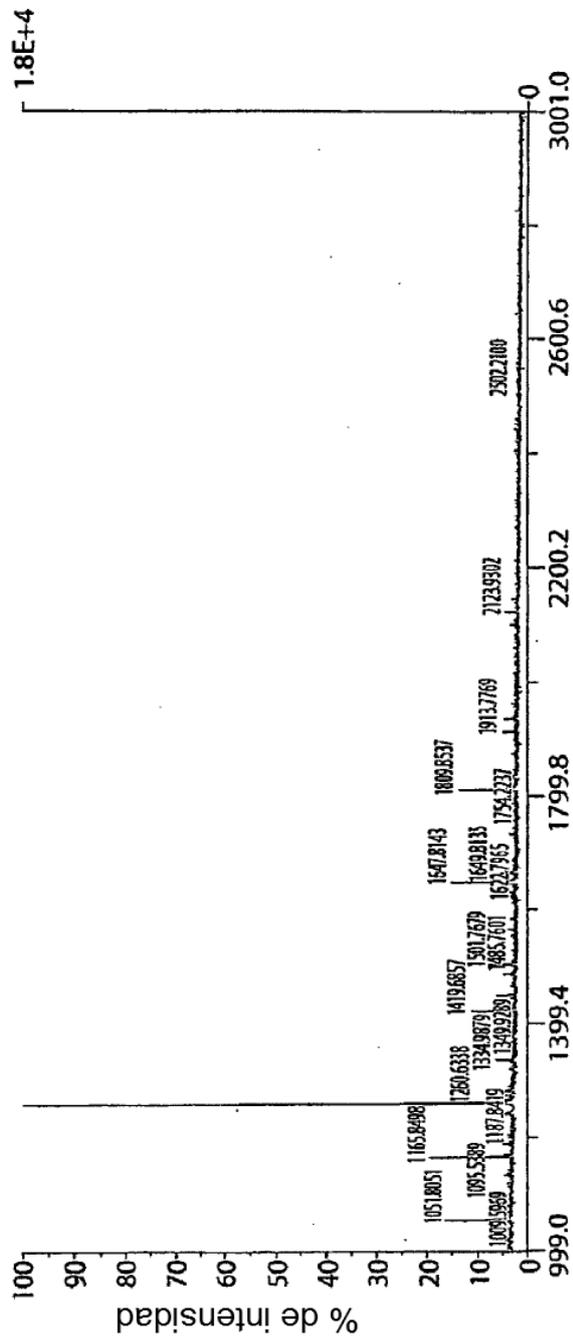


Fig. 1A

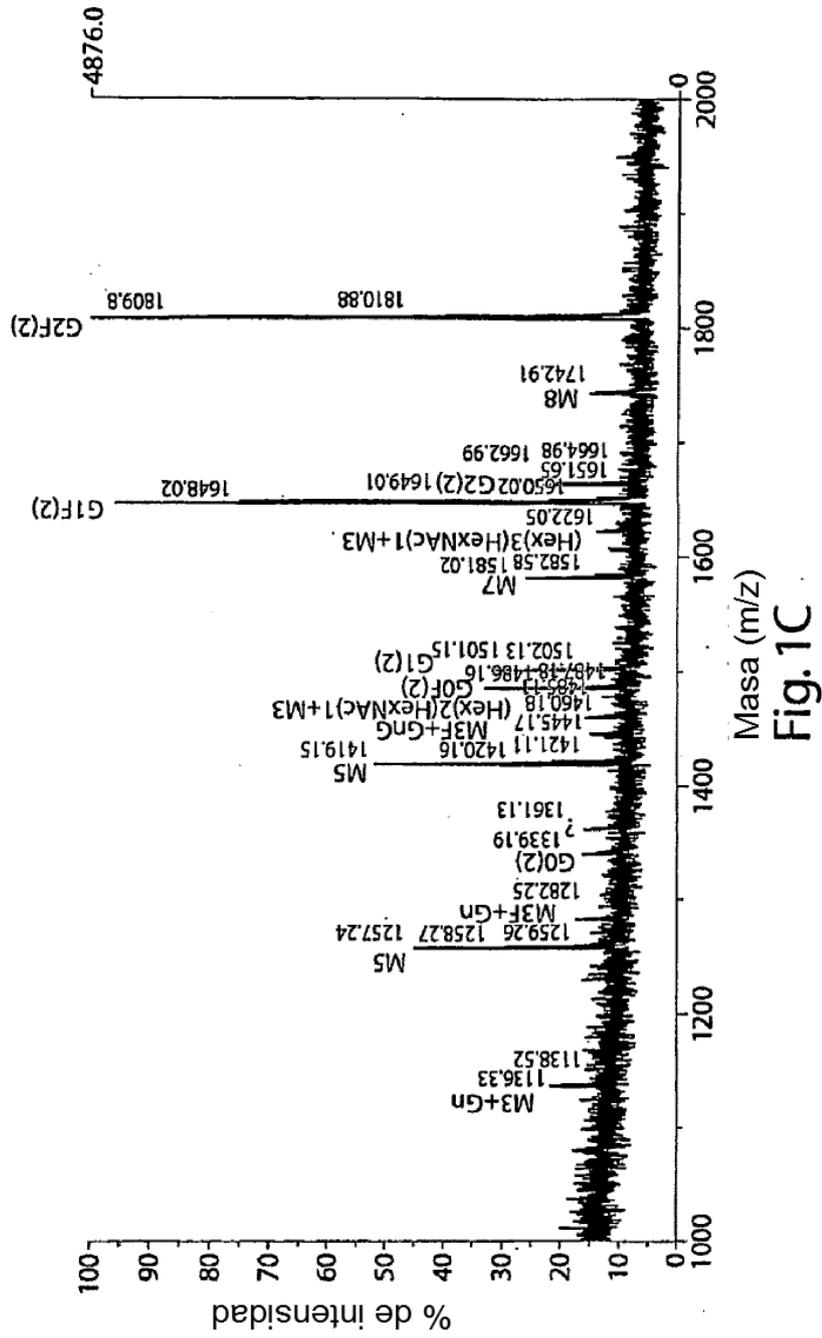


Fig. 1C

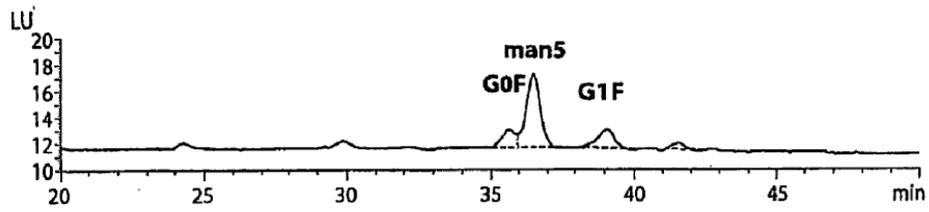


Fig. 2A

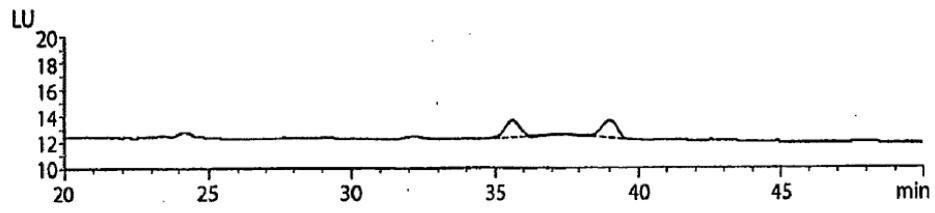
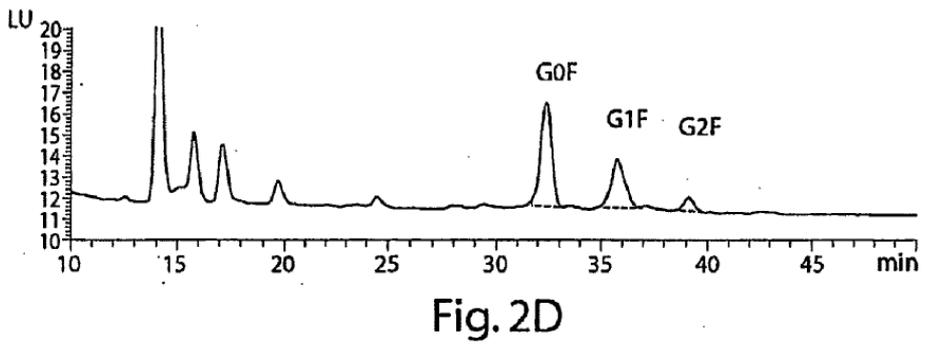
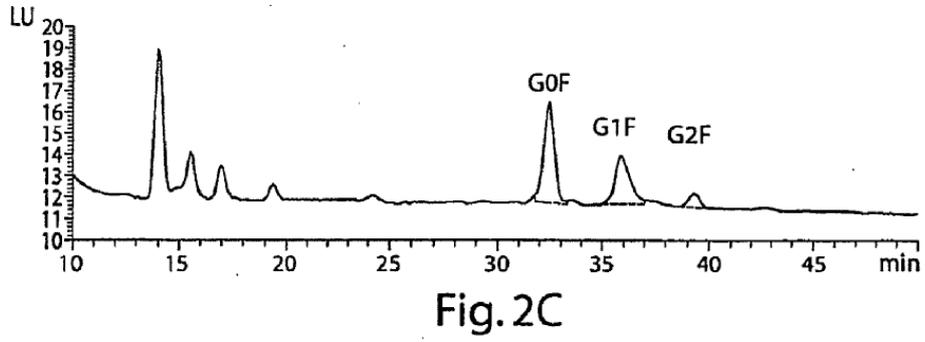


Fig. 2B



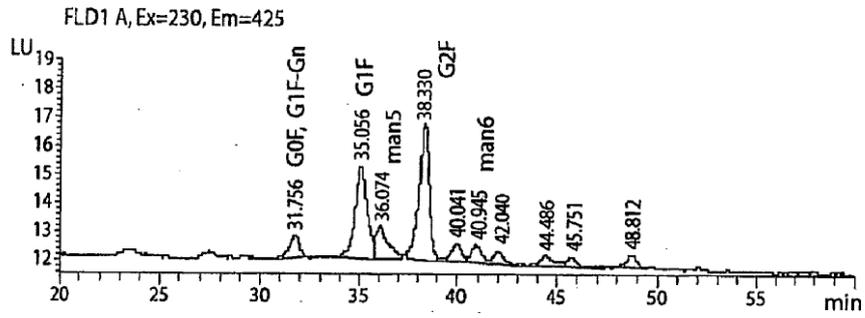


Fig. 2E

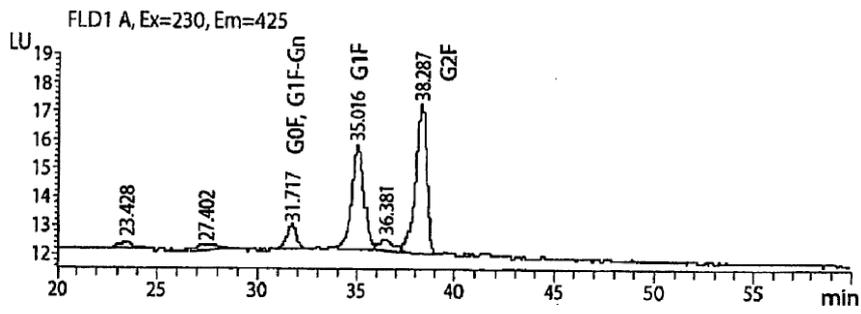


Fig. 2F

Anti CD137 de células 293 humanas

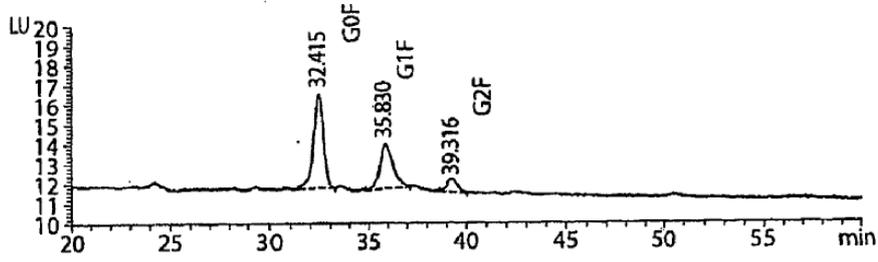


Fig. 3A

Anti CD137 de células 293 humanas tratadas con Endo H

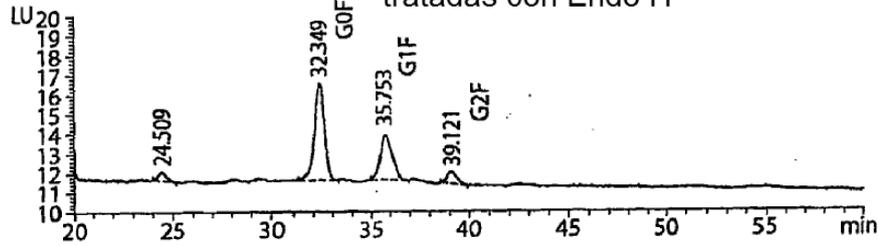


Fig. 3B

Anti CD137 de células 293 humanas

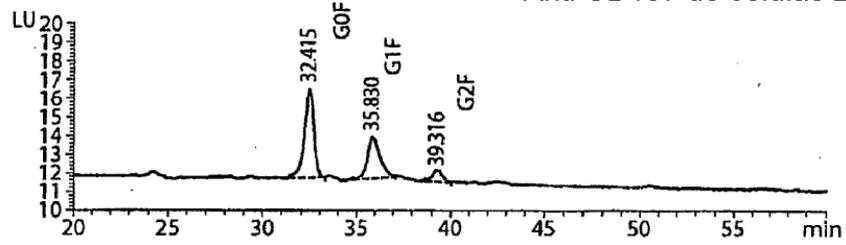


Fig. 3C

Anti CD137 de células 293 humanas tratadas con Endo H

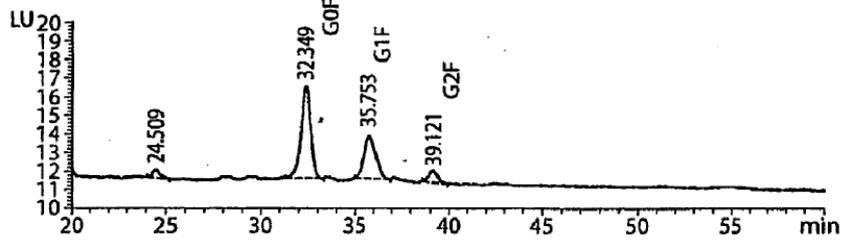


Fig. 3D

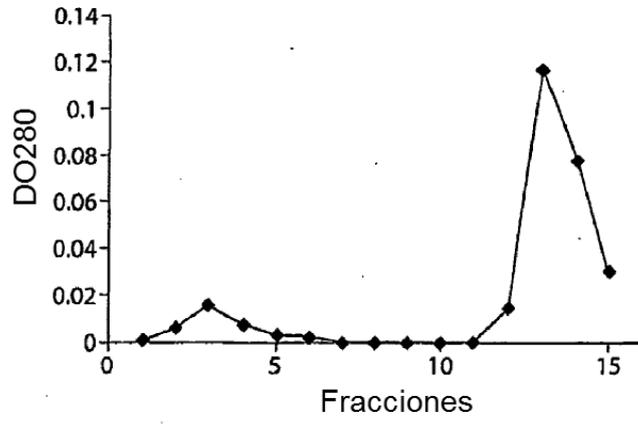


Fig. 4A

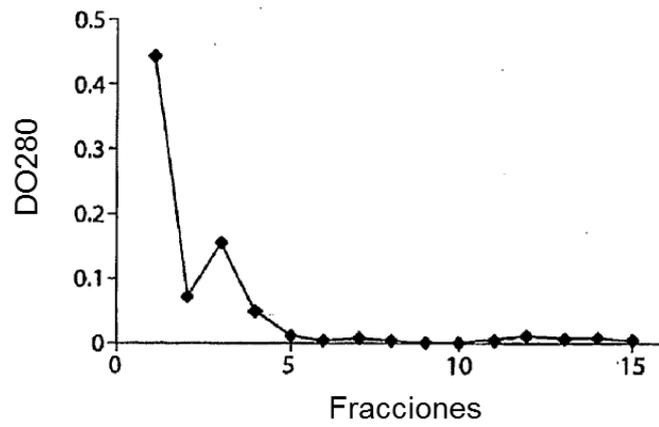


Fig. 4B

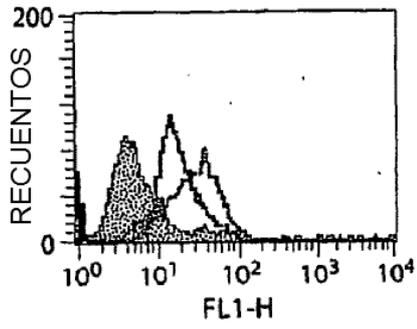


Fig. 5A

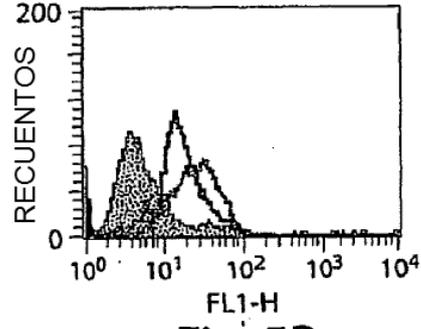


Fig. 5B

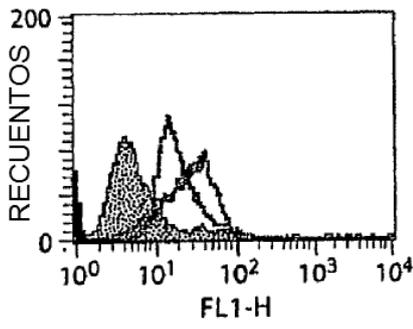


Fig. 5C

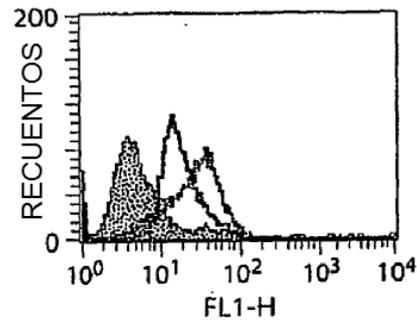


Fig. 5D

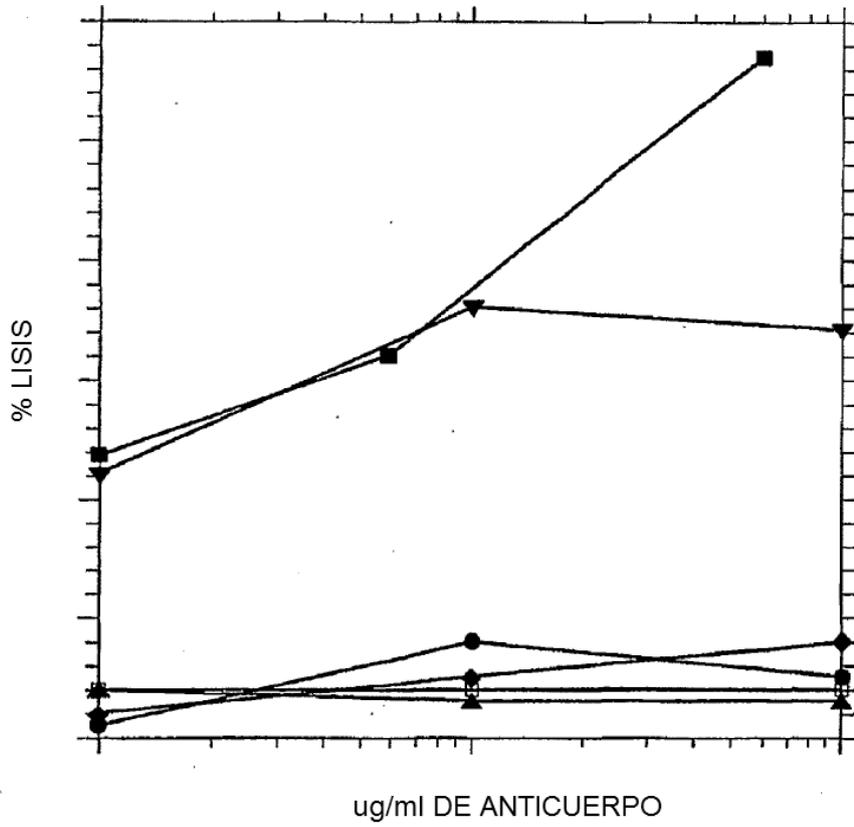


Fig.6

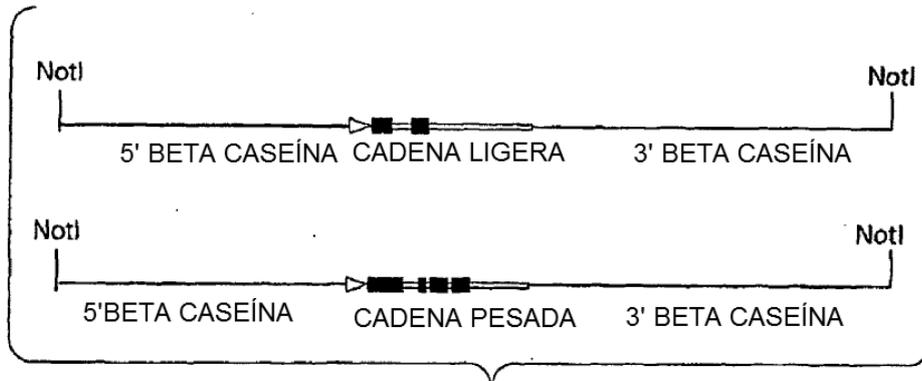


Fig. 7

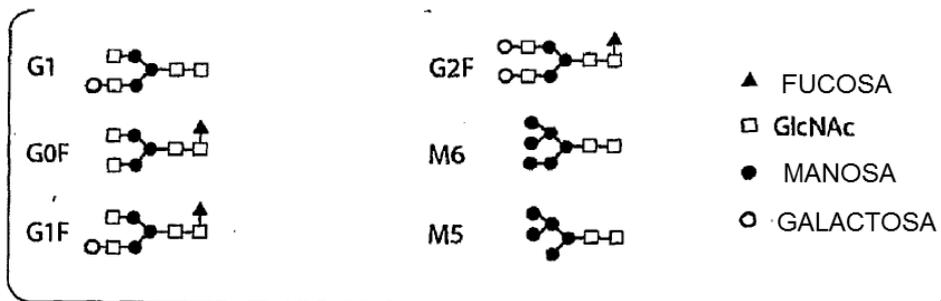


Fig. 8

DIAGRAMA DE FLUJO DE UN EJEMPLO DE UN MÉTODO DE PRODUCCIÓN

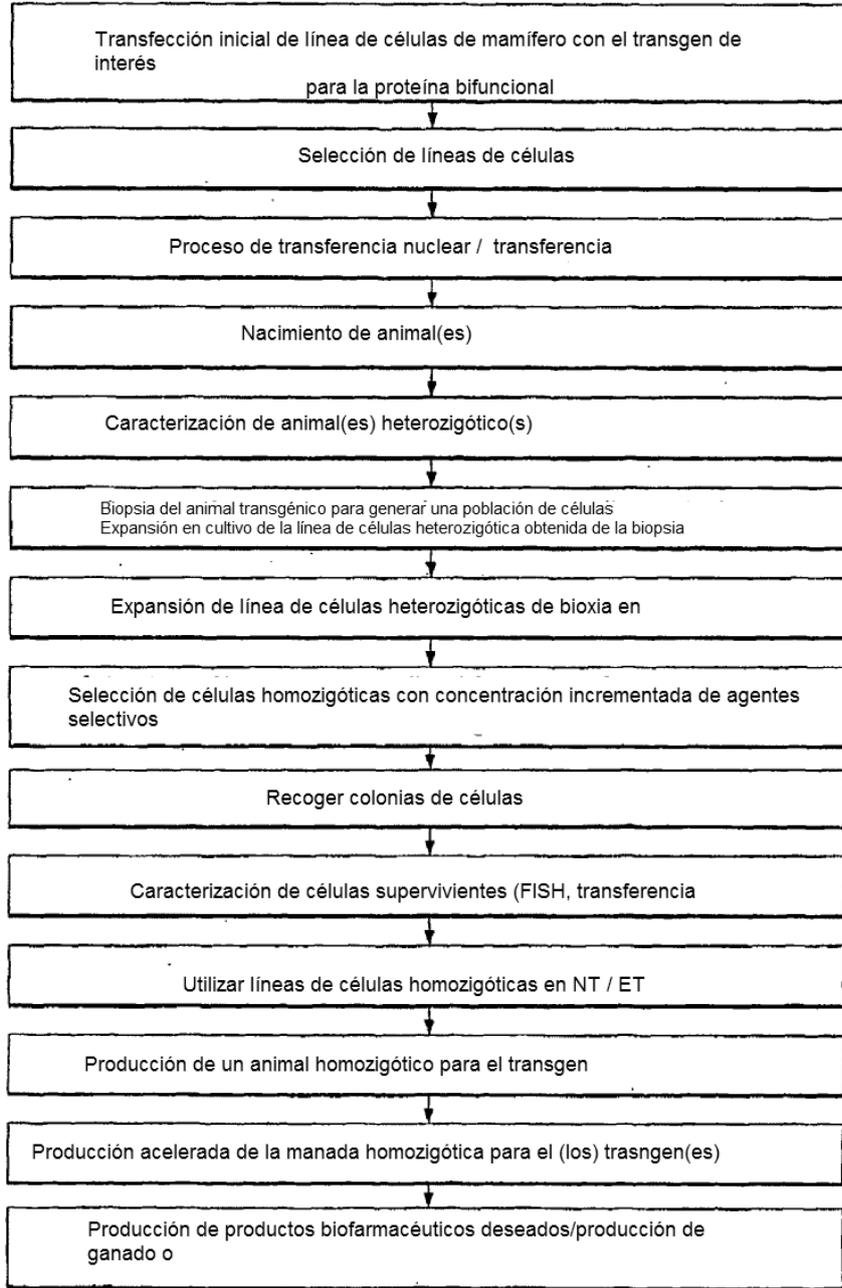


Fig. 9

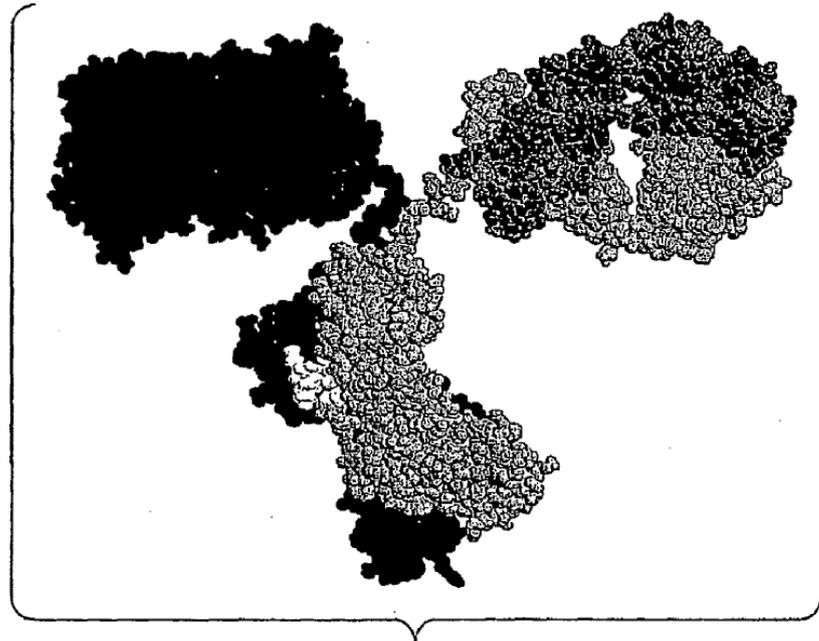


Fig. 10A

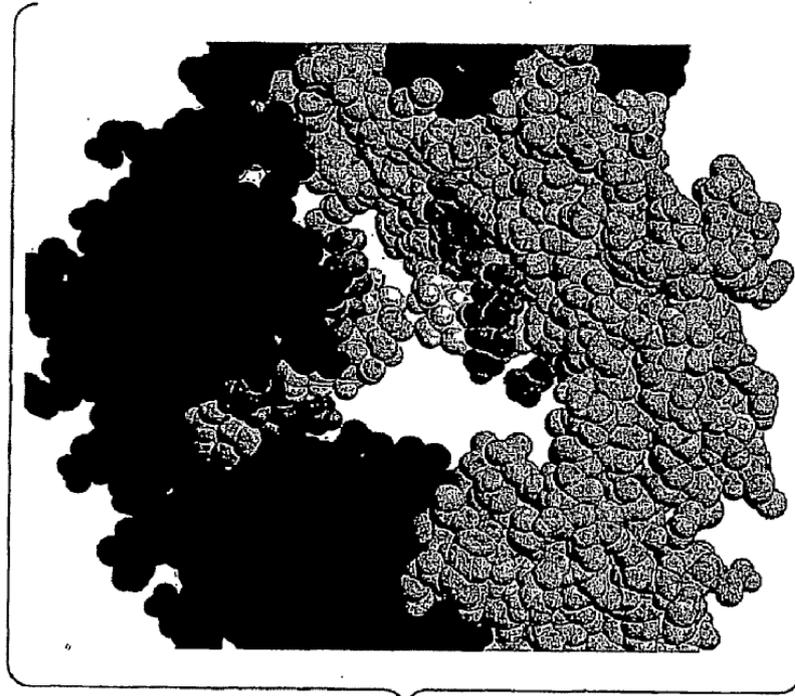


Fig. 10B

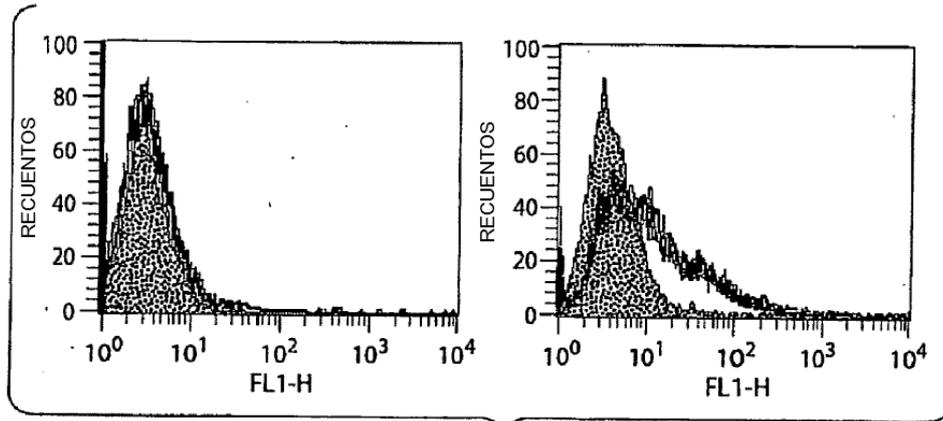


Fig. 11

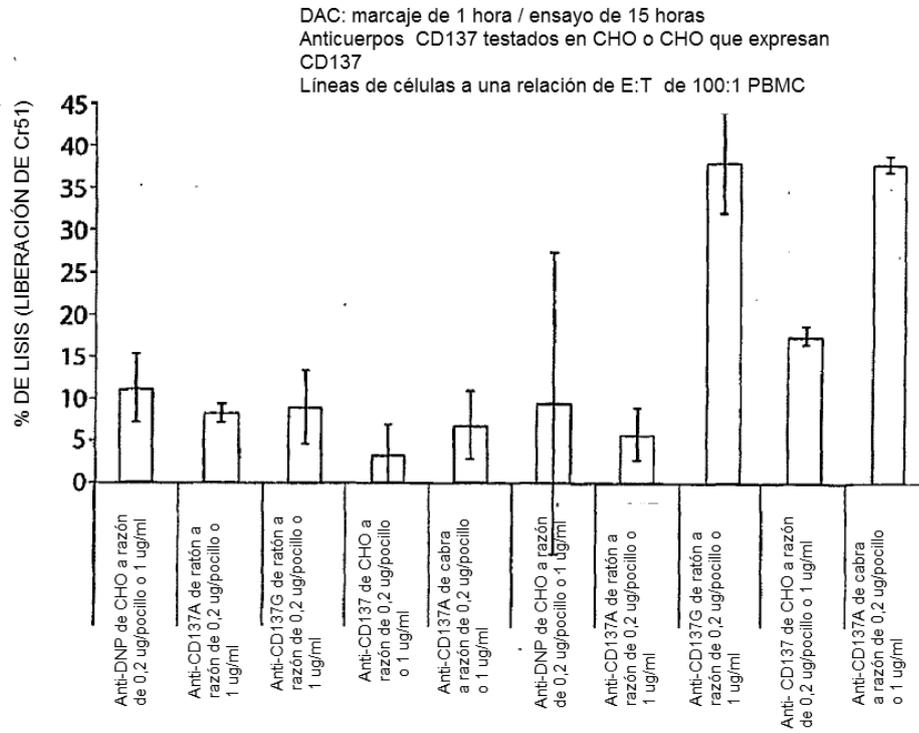


Fig. 12

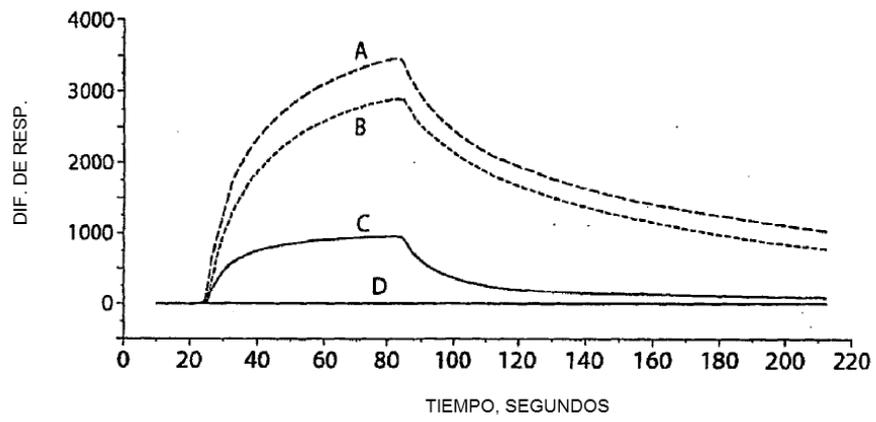


Fig. 13

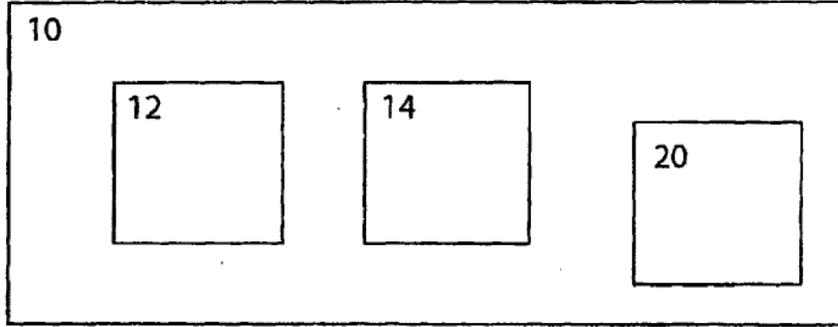


Fig. 14