

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 150**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2013 PCT/US2013/048105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2013 E 13734632 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2867251**

54 Título: **Métodos para reducir la agregación de glucoproteínas**

30 Prioridad:

29.06.2012 US 201261666296 P
26.06.2013 US 201361839393 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2020

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

QIAN, YUEMING;
KHATTAK, SARWAT F. y
LI, ZHENGJIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 753 150 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para reducir la agregación de glucoproteínas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para reducir la agregación de glucoproteínas mediante la optimización del número de sitios de glucosilación unidos a O.

10 **Antecedentes de la invención**

La glucosilación de proteínas es un atributo crítico de calidad para determinar la potencia y la longevidad farmacocinética de un producto biológico. Comprender cómo cada sitio de glucosilación afecta la función general de la proteína ayuda a optimizar la calidad del producto final. Al lograr un perfil de glucosilación homogéneo, se pueden lograr aumentos en el rendimiento asegurando la comparabilidad del producto.

La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina. Los restos de azúcar unidos a O tienen menos reglas estructurales que la glucosilación unida a N y, por lo tanto, crean una mayor diversidad en las glucoformas. La glucosilación unida a O es difícil de predecir debido a la falta de secuencias consenso de reconocimiento. Sin embargo, se han desarrollado enfoques de redes neuronales para predecir mejor los sitios unidos a O de tipo mucina (Julenius, K., et al. 2005. *Glycobiology* 15, 153-164). Si bien la mayoría de los informes hasta la fecha documentan el papel de los O-polisacáridos en la capacidad de unión de las glucoproteínas o en el enmascaramiento de su cadena principal peptídica, un estudio de caso particular demuestra que análogos de la hormona folitropina (FSH, de sus siglas en inglés) con más sitios unidos a O son menos bioactivos que análogos de la FSH con sitios de glucosilación unidos a N aumentados (Weenen, C. et al. 2004. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5204-5212). Se ha demostrado que los polisacáridos unidos a O no son esenciales para la expresión de la glucoproteína gC-1 en la superficie celular, pero pueden interferir con el dominio de unión de su epítipo y su capacidad de unión (Biller, M. et al. 2000. *Glycobiology* 10, 1259-1269). La glucosilación de glucoproteínas como las moléculas CTLA4-Ig se describe en el documento WO 2007/076032 A2. Los polipéptidos Fc (de cadena sencilla) glucosilados y aglucosilados se describen en los documentos WO 2010/085682 A2 y WO 2008/143954 A2. La modificación del patrón de glucosilación unida a O se ha descrito, por ejemplo, para trombomodulina de cadena sencilla, BAFF-R humano o proteínas de interferón variantes (documento EP 1 449 849 A2; documento US 2006/0234917 A1; documento US 2004/0137581 A1). Los métodos para controlar la glucosilación unida a O de polipéptidos se describen en el documento WO 2010/128145 A1.

Se cree que la presencia de glucosilación afecta la inmunogenicidad, eficacia, solubilidad y semivida de los productos biológicos comerciales (Lis, H. et al. 1993. *Eur J Biochem* 218, 1-27; Lowe, J.B. et al. 2003. *Annu Rev Biochem* 72, 643-691; Van den Steen, P. et al. 1998. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 151-208). Sin embargo, la mayoría de la literatura se centra en los efectos de la glucosilación unida a N (Hossler, P. et al. 2009. *Glycobiology* 19, 936-949). La información sobre los efectos de la glucosilación unida a O en la calidad de la proteína es escasa; especialmente con respecto a la agregación de proteínas.

La agregación de una proteína terapéutica durante la fabricación no es deseable y requiere un procesamiento extensivo de la cadena abajo para su eliminación. Por lo tanto, existe una necesidad de minimizar la agregación de proteínas, lo que da como resultado la reducción de los costes de fabricación y la optimización acelerada del proceso. El descubrimiento de la relación entre la glucosilación unida a O y la agregación de una glucoproteína terapéutica permite al fabricante modificar la glucoproteína terapéutica de forma temprana en el desarrollo del producto.

50 **Sumario de la invención**

Esta invención proporciona métodos para reducir la agregación de glucoproteínas mediante la optimización del número de sitios de glucosilación unidos a O. La invención se refiere a un método para reducir la agregación de glucoproteínas que comprende eliminar uno o más sitios de glucosilación unidos a O en las mismas, en donde la glucoproteína comprende la región bisagra de un dominio Fc y en donde los sitios de glucosilación unidos a O que se eliminarán están en dicha región bisagra. La glucoproteína puede ser una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender la porción bisagra de la región Fc de una inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina humana puede ser IgG humana.

En una realización, el uno o más sitios de glucosilación unidos a O se eliminan mediante sustitución y/o eliminación de aminoácidos. El uno o más sitios de glucosilación unidos a O sustituidos y/o eliminados pueden estar en la región bisagra de un dominio Fc que se muestra en la SEQ ID NO: 5. Los sitios de glucosilación unidos a O en la región bisagra del dominio Fc que se muestra en la SEQ ID NO: 5 que pueden eliminarse se seleccionan de S248, T252, T254. El uno o más sitios de glucosilación unidos a O sustituidos y/o eliminados pueden estar en la región bisagra del dominio Fc mutado que se muestra en la SEQ ID NO: 4. Los sitios de glucosilación unidos a O en la región

bisagra del dominio Fc que se muestra en la SEQ ID NO: 4 que pueden eliminarse se seleccionan de S129, S130, S136, S139, T133 y T135.

5 La invención proporciona la glucoproteína de fusión CTLA4lg como se muestra en la Figura 6, en donde al menos uno de los sitios de glucosilación unido a O seleccionado entre S129 y S139 está sustituido y/o eliminado.

Breve descripción de las figuras

10 Las Figuras 1A - 1C muestran los sitios de glucosilación en belatacept. **A** muestra los sitios de glucosilación unidos a N y de glucosilación unidos a O, deducidos de los datos publicados (AMA 2008; Schwartz et al. 2001). **B** muestra sitios de glucosilación unidos a O, mapeados mediante análisis de espectrometría de masas en fragmentos de péptidos trípticos (SEQ ID NO: 3). Un sitio unido a O no se pudo asignar definitivamente a S129 o S130. **C** muestra los sitios de glucosilación unidos a O pronosticados por el método de red neuronal NetOGlyc3.1 (SEQ ID NO: 4). La secuencia de aminoácidos de belatacept que se muestra en la Figura 6 se utilizó como entrada en el programa informático NetOGlyc3.1 en línea en www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc.

15 La Figura 2 muestra que no existe una correlación entre el número de supuestos sitios unidos a O y el contenido total de ácido siálico. La sialilación total constante se detectó cuando no había glucosilación unida a O en tres mutantes (rodeados por una línea de puntos).

20 Las Figuras 3A - 3D identifican la glucosilación unida a O en sitios ocultos. **A** es un diagrama que ilustra estructuras comunes de O-polisacárido. El número entre paréntesis es el peso molecular. Gal - galactosa; GalNAc - N-acetilgalactosamina. **B** es un espectro de masas deconvolucionado que muestra glucosilación unida a O en belatacept de tipo silvestre. **C** es un espectro de masas deconvolucionado que muestra glucosilación unida a O en el mutante que no tenía S129, S130 y S139. La glucosilación unida a O en T133, T135 y S136 fue más detectable en el mutante después de la eliminación triple en S129, S130 y S139. **D** es un espectro de masas deconvolucionado que no muestra glucosilación unida a O en el mutante que no tenía S129, S130 y S139 y en el que T133, T135 y S136 fueron sustituidos con alanina.

25 Las Figuras 4A -4C muestran la formación de O-glucoformas variables mediante mutación única en el mismo sitio. **A** es un espectro de masas deconvolucionado que muestra glucosilación unida a O en el mutante con eliminación de S129. **B** es un espectro de masas deconvolucionado que muestra glucosilación unida a O en el mutante con sustitución de glutamina en la posición 129. **C** es un espectro de masas deconvolucionado que no muestra glucosilación unida a O en el mutante con S129 intacto y sustitución de alanina en las posiciones 130, 133, 135, 136 y 139.

30 La Figura 5 muestra la reducción en porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW, de sus siglas en inglés) con respecto a los sitios unidos a O mutados; datos normalizados al 100 % en control de tipo silvestre. Había seis posibles sitios unidos a O y se crearon mutantes para eliminar de uno a los seis sitios de glucosilación.

35 La Figura 6 (SEQ ID NO: 1 y 2) representa una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de belatacept, una proteína de fusión del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA4, de sus siglas en inglés) que comprende un péptido señal (alanina en la posición -1 a metionina en la posición -26); un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o comienza en alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; un enlazador de ácido glutámico en la posición +125; y los dominios bisagra-CH2-CH3 del dominio Fc de un anticuerpo humano de inmunoglobulina G1 en la posición +126 a +357. Las SEQ ID NO: 1 y 2 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de belatacept, respectivamente, de belatacept, una proteína de fusión de CTLA4, que comprende un péptido señal de 26 aminoácidos; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y termina en ácido aspártico en la posición +150, o comienza en alanina en la posición +26 y termina en ácido aspártico en la posición +150; un enlazador de ácido glutámico en la posición +151; y los dominios bisagra-CH2-CH3 del dominio Fc de un anticuerpo humano de inmunoglobulina G1 en la posición +152 a +383.

Descripción detallada de la invención

40 Todos los términos científicos y técnicos utilizados en esta solicitud tienen significados comúnmente utilizados en la materia a menos que se especifique lo contrario. Como se utiliza en esta solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

45 Tal como se usa en el presente documento, "belatacept" es una proteína de fusión que es una molécula mutante de CTLA4lg soluble que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre con cambios de aminoácidos A29Y (un resto de aminoácido tirosina que sustituye a una alanina en la posición 29) y L104E (un resto de aminoácido ácido glutámico que sustituye a una leucina en la posición +104), unido a una cola de Ig (incluida en la Figura 6, SEQ ID NO: 1 y 2; el ADN que codifica L104EA29Y-Ig se depositó el 20 de junio de 2000, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de sus siglas en inglés) bajo las disposiciones del Tratado de Budapest. Se le ha otorgado el número de acceso ATCC PTA-2104. L104EA29Y-Ig se describe con más detalle en la patente de EE.UU. 7.094.874, concedida el 22 de agosto de 2006.

50 Tal como se usa en el presente documento, "agregado" se usa indistintamente con "especies de alto peso

molecular". Por ejemplo, un agregado de alto peso molecular puede ser un tetramero, un pentámero o un hexámero.

El monómero, dímero y las especies de HMW de una glucoproteína pueden separarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés). La SEC separa las moléculas en función del tamaño molecular.

5 La separación se logra mediante la exclusión o inclusión molecular diferencial a medida que las moléculas migran a lo largo de la columna. Así, la resolución aumenta en función de la longitud de la columna. Por ejemplo, las muestras de moléculas CTLA4Ig se pueden separar usando una HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) equipada con columnas TSK Gel® G3000SWXL (300 mm x 7,8 mm) y TSK Gel® G3000SWXL (40 mm x 6,0 mm) (Tosoh Bioscience, Montgomery, PA) en tándem. Las muestras a 10 mg/ml (alícuota de 20 µl) se separan usando una fase móvil que consiste en KH₂PO₄ 0,2 M, NaCl al 0,9 %, pH 6,8, a un caudal de 1,0 ml/min. Las muestras se monitorean a una absorbancia de 280 nm utilizando el detector de longitud de onda dual 2487 de Water. Utilizando este sistema, la especie de HMW tiene un tiempo de retención de 7,5 min ± 1,0 min. Cada máximo está integrado para el área debajo del máximo. El % de especies de HMW se calculó dividiendo el área máxima de HMW entre el área máxima total.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "optimizar", "eliminar", "eliminación" y "eliminado" se usan indistintamente con los términos "sustituido" y/o "suprimido".

20 Tal como se usa en el presente documento, la "región bisagra" de un anticuerpo humano de inmunoglobulina une los brazos Fab a la pieza Fc. La flexibilidad de la región bisagra permite que los brazos Fab adopten una amplia gama de ángulos, lo que permite la unión a epítopos separados a distancias variables.

La región bisagra de la inmunoglobulina IgG humana comprende la secuencia de aminoácidos: 245 EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF 272 (SEQ ID NO: 5)

25 La región bisagra de belatacept comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con ácido glutámico en la posición +152 y termina en fenilalanina en la posición +179 como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

30 Esta invención proporciona métodos para reducir la agregación de glucoproteínas mediante la optimización del número de sitios de glucosilación unidos a O en las mismas. La invención se refiere a un método para reducir la agregación de glucoproteínas que comprende la eliminación de uno o más sitios de glucosilación unidos a O en las mismas, en donde la glucoproteína comprende la región bisagra de un dominio Fc y en donde los sitios de glucosilación unidos a O que se eliminarán están en dicha región bisagra. La glucoproteína puede ser una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender la porción bisagra de una región Fc de una inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina humana puede ser IgG humana.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la agregación de glucoproteínas que comprende sustituir y/o eliminar al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O dentro de la región bisagra del dominio Fc, en donde el sitio de glucosilación unido a O se selecciona de S248, T252, T254 como se muestra en la SEQ ID NO: 5.

40 La cantidad de especies de alto peso molecular (HMW) es un parámetro importante de control de calidad en la fabricación de productos biológicos, y la formación de HMW es un efecto secundario indeseable en los sistemas de expresión de proteínas terapéuticas. Las especies de HMW se forman de forma covalente o no covalente y se consideran agregados proteicos.

45 Con el fin de comprender mejor los efectos de la glucosilación unida a O de las proteínas terapéuticas, se eligió un modelo altamente glucosilado para investigación-belatacept (Nulojix®), una proteína de fusión CTLA4-Ig. Los sitios de glucosilación unidos a N y unidos a O conocidos para belatacept se muestran en la Figura 1A. La secuenciación de aminoácidos y el mapeo de péptidos han confirmado que hay tres sitios de glucosilación unidos a N y dos sitios de unión a O dominantes en belatacept y abatacept (Fig. 1B), pero el método de red neuronal NetOGlyc3.1 predijo que había seis sitios unidos a O agrupados entre S129 y S139 (Fig. 1C). Esta discrepancia refleja la heterogeneidad del polisacárido unido a O con respecto a la ocupación variable del sitio (macroheterogeneidad).

50 Como se muestra en el Ejemplo 1, la agregación de proteínas se redujo mediante la eliminación de sitios unidos a O a través de sustitución o eliminación juzgada por una reducción significativa en la cantidad de especies de HMW en los productos proteicos. La agregación de proteínas se reduce del 5 % al 98 %, del 8 % al 60 %, del 8 % al 30 mediante la eliminación de al menos uno o más sitios de glucosilación unidos a O.

55 En un aspecto, el método para reducir la agregación de glucoproteínas de acuerdo con la invención comprende la sustitución y/o eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O dentro de la región bisagra que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

60 En otro aspecto, el método para reducir la agregación de glucoproteínas de acuerdo con la invención comprende la sustitución y/o eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O, seleccionados entre S129, S130, S136, S139, T133 y T135 mostrados en la SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, el método para reducir la agregación de glucoproteínas de acuerdo con la invención comprende la sustitución y/o eliminación de los sitios de glucosilación unidos a O S129 y/o S139 mostrados en la SEQ ID NO: 4.

5 En el Ejemplo 1, la mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo con una eliminación o sustitución completa con alanina o glutamina. Normalmente, los restos que sobresalen de la superficie de la molécula se sustituyen con alanina y los restos enterrados se sustituyen con glutamina para evitar el colapso estructural. Con respecto a la creación de una proteína funcional, la única diferencia entre una alanina y una serina es la sustitución de hidrógeno con un hidroxilo, que es poco probable que modifique la estructura general de la proteína. En este modelo de
10 proteína, incluso una eliminación completa del aminoácido todavía dio como resultado la secreción de una proteína plegada adecuadamente.

En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 en donde se elimina el sitio de glucosilación unido a O S129 o S139.

15 En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 en donde se elimina el sitio de glucosilación unido a O S129 y S139.

En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 en donde S129 está sustituido con alanina (A).

En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 en donde S139 está sustituido con alanina (A).

25 En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 que tiene sustituciones A130A133A135A136A139.

En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 que tiene sustituciones A129A133A135A136A139.

30 En otro aspecto, la invención proporciona la proteína de fusión mostrada en la Figura 6 en donde se eliminan los aminoácidos S129S130S139.

En otro aspecto, la proteína de fusión como se muestra en la Figura 6 de acuerdo con la invención puede comprender la sustitución de uno o más de S130, T133, T135 y S136 con alanina (A).

Métodos para producir las moléculas CTLA4Ig de la invención

40 La expresión de las moléculas CTLA4Ig puede estar en células procariotas. Las procariotas con mayor frecuencia están representadas por varias cepas de bacterias. La bacteria puede ser una gram positiva o una gram negativa. Normalmente, se prefieren bacterias gram-negativas como *E. coli*. También se pueden usar otras cepas microbianas.

45 Las secuencias, descritas anteriormente, que codifican moléculas CTLA4Ig se pueden insertar en un vector diseñado para expresar secuencias extrañas en células procariotas tales como *E. coli*. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procariotas de uso común que se definen en el presente documento para incluir promotores para el inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias del sitio de unión a ribosomas, incluir promotores usados comúnmente como los sistemas promotores de beta-lactamasa (penicilinas) y lactosa (*lac*) (Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) y el promotor P_L procedente de lambda y sitio de unión al ribosoma del gen N (Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292: 128).

50 Dichos vectores de expresión también incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables, tales como un gen de beta-lactamasa o neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a antibióticos, de modo que los vectores pueden replicarse en bacterias y las células que portan los plásmidos se pueden seleccionar cuando crecen en presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

60 El plásmido de expresión se puede introducir en células procariotas mediante varios métodos estándar, que incluyen, pero no se limitan a, CaCl₂-shock (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, y Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, (1989)) y electroporación.

De acuerdo con la práctica de la invención, las células eucariotas también son células hospedadoras adecuadas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen cualquier célula animal, ya sea primaria o inmortalizada, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), y células vegetales. Las células de mieloma, COS y CHO son ejemplos de células animales que pueden usarse como hospedadores. Las células CHO particulares incluyen, pero no se limitan a, DG44 (Chasin, et al., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-

- 556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (n.º ATCC CCL-61), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), clon 13 de CHO (GEIMG, Génova, IT), clon B de CHO (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), y RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Las células vegetales ilustrativas incluyen tabaco (plantas enteras, cultivo celular o callo), maíz, soja y células de arroz. Las semillas de maíz, soja y arroz también son aceptables.
- Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas CTLA4Ig descritas anteriormente también se pueden insertar en un vector diseñado para expresar secuencias extrañas en un hospedador eucariota. Los elementos reguladores del vector pueden variar de acuerdo con el hospedador eucariota particular.
- Entre las secuencias de control eucariotas de uso habitual para generar vectores de expresión se incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero, tales como, por ejemplo, el promotor CMV (vector CDM8) y el virus del sarcoma aviar (ASV, de sus siglas en inglés) (vector π EN). Otros promotores utilizados comúnmente incluyen los promotores temprano y tardío del virus de simio 40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113) u otros promotores virales como los procedentes del poliovirus, el adenovirus 2 y el virus del papiloma bovino. También se puede usar un promotor inducible, como hMTII (Karin, et al., (1982) *Nature* 299: 797-802).
- Los vectores para expresar moléculas CTLA4Ig en eucariotas también pueden llevar secuencias llamadas regiones potenciadoras. Estas son importantes para optimizar la expresión génica y se encuentran cadena arriba o cadena abajo de la región promotora.
- Entre los ejemplos de vectores de expresión para las células hospedadoras eucariotas se incluyen, pero no se limitan a, vectores para células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)), vectores retrovirales (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) o formas modificadas de los mismos, vectores adenovirales; vectores asociados con adenovirus, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)).
- Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas CTLA4Ig se pueden integrar en el genoma de la célula hospedadora eucariota y replicar a medida que el genoma hospedador se replica. Como alternativa, el vector que lleva moléculas CTLA4Ig puede contener orígenes de replicación permitiendo la replicación extracromosómica.
- Para expresar las secuencias de ácido nucleico en *Saccharomyces cerevisiae*, el origen de la replicación del plásmido de levadura endógena, se puede usar el círculo de 2 μ . (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307). Como alternativa, se pueden usar secuencias del genoma de levadura capaces de promover la replicación autónoma (véase, por ejemplo, Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39); Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157; y Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300).
- Las secuencias de control transcripcional para vectores de levadura incluyen promotores para la síntesis de enzimas glucolíticas (Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900). Los promotores adicionales conocidos en la materia incluyen el promotor CMV proporcionado en el vector CDM8 (Toyama y Okayama, (1990) *FEBS* 268: 217-221); el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073) y los de otras enzimas glucolíticas.
- Otros promotores son inducibles porque se pueden regular mediante estímulos ambientales o el medio de crecimiento de las células. Estos promotores inducibles incluyen los de los genes para proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas asociadas con el catabolismo de nitrógeno y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.
- Las secuencias reguladoras también se pueden colocar en el extremo 3' de las secuencias codificantes. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar el ARN mensajero. Dichos terminadores se encuentran en la región no traducida 3' después de las secuencias codificantes en varios genes procedentes de levaduras y de mamíferos.
- Los vectores ilustrativos para plantas y células vegetales incluyen, pero no se limitan a, plásmidos Tj de *Agrobacterium*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV, de sus siglas en inglés) y virus del mosaico dorado del tomate (TGMV, de sus siglas en inglés).
- Las células de mamífero se pueden transformar mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, transfección en presencia de fosfato de calcio, microinyección, electroporación o mediante transducción con vectores virales.
- Los métodos para introducir secuencias de ADN extrañas en genomas de plantas y levaduras incluyen (1) métodos mecánicos, tal como microinyección de ADN en células individuales o protoplastos, agitar células con perlas de vidrio en presencia de ADN o disparar esferas de tungsteno u oro recubiertas de ADN en células o protoplastos; (2) introducir ADN haciendo que las membranas celulares sean permeables a macromoléculas a través del tratamiento con polietilenglicol o la sujeción a pulsos eléctricos de alto voltaje (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que

contienen ADNc) que se fusionan con las membranas celulares.

La patente de EE.UU. número 7.541.164 y la patente de EE.UU. número 7.332.303 enseñan procesos para la producción de proteínas de la invención, específicamente productos de glucoproteína recombinante, mediante cultivos celulares animales o de mamíferos.

Después de la fase de producción de proteínas del proceso de cultivo celular, las moléculas CTLA4Ig se recuperan del medio de cultivo celular utilizando técnicas entendidas por un experto en la materia. En particular, la molécula CTLA4Ig se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado.

El medio de cultivo se centrifuga inicialmente para eliminar los desechos celulares y las partículas. La proteína deseada se purifica posteriormente a partir de ADN contaminante, proteínas solubles y polipéptidos, con los siguientes procedimientos de purificación no limitantes bien establecidos en la materia: SDS-PAGE; precipitación en sulfato amónico; precipitación en etanol; fraccionamiento en inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio aniónico como QAE o DEAE; cromatoenfoco; filtración en gel usando, por ejemplo, columna Sephadex G-75™; columnas de proteína A Sepharose™ para eliminar contaminantes tales como IgG. La adición de un inhibidor de proteasa, como el fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, de sus siglas en inglés), o una mezcla de cóctel inhibidor de proteasa también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Una persona experta en la materia reconocerá que los métodos de purificación adecuados para una proteína de interés, por ejemplo, una glucoproteína, pueden requerir alteraciones para tener en cuenta los cambios en el carácter de la proteína tras la expresión en cultivo celular recombinante.

Las técnicas y métodos de purificación que seleccionan los grupos carbohidrato de la glucoproteína también son útiles dentro del contexto de la presente invención. Por ejemplo, dichas técnicas incluyen, HPLC o cromatografía de intercambio iónico usando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en donde se recoge la fracción más básica o más ácida, dependiendo de qué carbohidrato se seleccione. El uso de dichas técnicas también puede dar como resultado la eliminación simultánea de contaminantes.

El método de purificación puede comprender además pasos adicionales que inactivan y/o eliminan virus y/o retrovirus que podrían estar presentes en el medio de cultivo celular de líneas celulares de mamíferos. Hay disponible un número significativo de pasos de eliminación viral, que incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con caótropos como urea o guanidina, detergentes, pasos adicionales de ultrafiltración/diafiltración, separación convencional, como cromatografía de intercambio iónico o exclusión por tamaño, pH extremos, calor, proteasas, disolventes orgánicos o cualquier combinación de los mismos.

La molécula CTLA4Ig purificada requiere concentración y un intercambio de tampón antes del almacenamiento o procesamiento adicional. Se puede usar un sistema Pall Filtron TFF para concentrar e intercambiar el tampón de elución de la columna de purificación previa con el tampón final deseado para la sustancia farmacológica.

En un aspecto, las moléculas CTLA4Ig purificadas, que se han concentrado y sometido a la etapa de diafiltración, se pueden llenar en botellas Biotainer® de 2 l, bolsa de bioproceso de 50 l o cualquier otro recipiente adecuado. Las moléculas CTLA4Ig en dichos vasos se pueden almacenar durante aproximadamente 60 días a una temperatura de 2 ° a 8 °C antes de la congelación. El almacenamiento prolongado de moléculas CTLA4Ig purificadas a una temperatura de 2 ° a 8 °C puede conducir a un aumento en la proporción de especies de HMW. Por lo tanto, para el almacenamiento a largo plazo, las moléculas CTLA4Ig se pueden congelar a aproximadamente -70 °C antes del almacenamiento y almacenarse a una temperatura de aproximadamente -40 °C. La temperatura de congelación puede variar de aproximadamente -50 °C a aproximadamente -90 °C. El tiempo de congelación puede variar y depende en gran medida del volumen del recipiente que contiene las moléculas CTLA4Ig y del número de recipientes que se cargan en el congelador. Por ejemplo, en una realización, las moléculas CTLA4Ig están en botellas Biotainer® de 2 l. La carga de menos de cuatro botellas Biotainer® de 2 l en el congelador puede requerir de aproximadamente 14 a al menos 18 horas de tiempo de congelación. La carga de al menos cuatro botellas puede requerir de aproximadamente 18 a al menos 24 horas de tiempo de congelación. Los recipientes con moléculas CTLA4Ig congeladas se almacenan a una temperatura de aproximadamente -35 °C a aproximadamente -55 °C. El tiempo de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -35 °C a aproximadamente -55 °C puede variar y puede ser tan corto como 18 horas. La sustancia farmacológica congelada se puede descongelar de manera controlada para la formulación del producto farmacéutico.

Las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. en trámite N.º: US20090252749 y US20100166774A1 presentadas el 19 de diciembre de 2006, enseñan procesos para la producción de proteínas de la invención, específicamente productos de glucoproteína recombinante, mediante cultivos celulares animales o de mamíferos.

Ejemplo 1

El propósito de este estudio fue comprender el fenómeno de la macroheterogeneidad con el objetivo de diseñar glucoproteínas con polisacáridos más homogéneos mediante mutagénesis dirigida al sitio de sitios unidos a O y

definir la relación entre los sitios unidos a O y la agregación.

Materiales y métodos

5 Líneas celulares y condición de cultivo

Se cultivaron células en suspensión de riñón embrionario humano 293-F (HEK293-F) FreeStyle (Invitrogen) en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) sin suero y se pasaron en matraces de agitación cada tres días. Las células se incubaron a 130 rpm en una plataforma agitadora orbital en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 6 % en aire.

10 Predicciones computacionales de sitios de glucosilación unidos a O

Los sitios de glucosilación unidos a O de belatacept se predijeron mediante el método de red neuronal NetOGlyc3.1 en www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc. El resultado para belatacept de tipo silvestre se muestra en la Figura 1C. La secuencia de aminoácidos de belatacept se utilizó como entrada en el programa de ordenador NetOGlyc3.1 en línea. El resultado predijo que belatacept contiene seis sitios de unión a O en S129, S130, T133, T135, S136 y S139.

20 Construcción de mutantes de proteínas de fusión

La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo con una eliminación o sustitución completa con alanina o glutamina. La reacción de mutagénesis se realizó con ADN plasmídico de belatacept metilado como plantilla, y con dos cebadores superpuestos, uno de los cuales contenía la mutación diana. Los productos de mutagénesis se transformaron en células competentes de *E. coli*, donde el ADN mutado lineal no metilado fue circularizado y replicado. Los ADN plasmídicos se purificaron con un kit de plásmido Maxi-prep (Qiagen, Mississauga, ON, Canadá) y se secuenciaron para confirmar que el mutante correcto estaba presente (Cogenics, Houston, TX).

Expresión transitoria de Belatacept y sus variantes en células en suspensión HEK-293F

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a 0,6 millones de células/ml y se agitaron en una plataforma agitadora orbital que giraba a 135 rpm a 37 °C con CO₂ al 6 %. El día de la transfección, las células se diluyeron a 1,0 millones de células/ml y se añadieron a un matraz de agitación de 125 ml a un volumen de cultivo de 30 ml. Cuarenta microgramos de ADN plasmídico se diluyeron en OptiPro SFM (Invitrogen) hasta un volumen total de 0,6 ml y se mezclaron. En un tubo separado, 40 µl de reactivo FreeStyle MAX (Invitrogen) también se diluyeron con Opti-Pro SFM hasta un volumen total de 0,6 ml. La solución de ADN diluida y el reactivo de transfección diluido se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla de ADN-transfección-reactivo se añadió luego lentamente a células recién diluidas en matraces de 125 ml. Se incubaron células transfectadas a 37 °C, CO₂ al 6 % en una plataforma agitadora orbital que giraba a 135 rpm durante 7 días en modo discontinuo.

40 Determinación de la concentración y purificación del mutante Belatacept

Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante diez minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C antes del ensayo de valoración del producto. La concentración de proteína de fusión se midió en un Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de cosecha se purificaron con columnas de rotación de proteína A (Sartorius) para una concentración final de 0,2-0,3 mg/ml.

Determinación de la sialilación total y la sialilación unida a N

Las muestras purificadas con proteína A se trataron con PNGasa y los polisacáridos unidos a N no sialilados y sialilados se marcaron con 2-AB (aminobenzamida). Los oligosacáridos marcados con 2-AB se separaron en fracciones neutras y ácidas utilizando un método de HPLC de intercambio aniónico débil que usa una columna Glyko-GlycoSep C (7,5 x 75 mm, Prozyme, San Leandro, CA). La fase móvil consistió en un gradiente, formado a partir de una solución de formiato de amonio 0,5 M, ajustado a pH 4,5 y una solución de acetonitrilo al 20 % (v/v) en agua. El caudal fue de 0,75 ml/min y la detección de fluorescencia se realizó utilizando una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm. El ácido siálico unido a N se calculó basándose en las fracciones de glucoformas sialiladas y no sialiladas.

El contenido total de ácido siálico se determinó mediante el método descrito anteriormente (Jing, Y., et al. 2010. *Biotechnol Bioeng* 107, 488-496). Los ácidos siálicos (ácido N-acetilneuramínico y ácido N-glicolilneuramínico) de la glucosilación unida a N y O se liberaron mediante hidrólisis ácida parcial y luego se separaron mediante HPLC de fase inversa. El ácido N-glicolilneuramínico estuvo por debajo del límite de detección en todos los casos (< 0,1 mol por mol de glucoproteína).

Las muestras sobrenadantes se purificaron con captura de proteína A y ácidos siálicos, incluidos N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), se liberaron mediante hidrólisis ácida parcial y

se separaron mediante HPLC de fase inversa para determinar el contenido total de ácido siálico, que procedieron tanto de la glucosilación unida a N como a la unida a O.

Determinación de la cinética de unión

5 La cinética de la unión de cada mutante y tipo silvestre a CD80-Ig se determinó mediante la inmovilización de CD80-Ig en la superficie del chip del sensor BIAcore a densidades de 200 UR. Se inyectaron concentraciones en el intervalo de 10-200 nM en tampón HBS-EP (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,005 %) (pH 7,4) sobre la superficie del chip sensor a un caudal de 30 μ l/min. Los datos de asociación y disociación se
10 recopilaron durante 3 y 5 minutos, respectivamente, a las diferentes concentraciones.

Determinación de glucoformas unidas a O

15 Las muestras purificadas con proteína A se diluyeron en Tris 100 mM, NaCl 25 mM, pH 7,6 y se incubaron con PNGasa F durante la noche para eliminar los oligosacáridos unidos a N. Luego, las muestras se añadieron con un patrón interno de insulina, se cargaron en un cartucho Waters Oasis HLB y se lavaron con 0,1 de ácido fórmico en acetonitrilo al 5 % seguido de elución en gradiente con 0,1 de ácido fórmico en acetonitrilo. Los voltajes capilar y de cono fueron de 3 kV y 30 V, respectivamente, y los escaneos se realizaron entre 800 y 2500 m/z. Los espectros fueron deconvolucionados por el algoritmo MaxEnt1 para determinar las masas moleculares y las especies de
20 polisacáridos unidos a O.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés)

25 La SEC se utilizó para identificar especies de alto peso molecular (HMW) en muestras de belatacept de tipo silvestre y mutantes mediante el método descrito anteriormente (Qian, Y., et al. 2010 Biotechnol Prog 26, 1417-1423). Las muestras purificadas con proteína A y el patrón de referencia se inyectaron directamente en una HPLC equipada con una columna Toso Haas Biosep TSK G3000SWXL de 7,8 x 300 mm. La separación fue isocrática utilizando PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente a un caudal de 0,5 ml/minuto durante 30 minutos. El perfil de elución isocrática se controló a 280 nm. La cuantificación se realizó mediante el cálculo de porcentajes relativos de área máxima de
30 especies de HMW, monómero y de bajo peso molecular (LMW, de sus siglas en inglés) entre el vacío y los volúmenes de inclusión.

Resultados

35 Expresión de proteínas, sialilación y cinética de unión

Tanto el belatacept de tipo silvestre como sus mutantes se expresaron de manera consistente en el sistema de expresión transitoria HEK, con todos los mutantes que secretan el título de proteína que varía de 100 a 150 mg/l; en particular, la exitosa síntesis y secreción de los mutantes en los que se eliminaron los seis supuestos sitios unidos a
40 O indica que la glucosilación unida a O no es esencial para la síntesis de belatacept.

Sorprendentemente, no hubo una correlación clara entre la sialilación total y el número de sitios unidos a O disponibles (Fig. 2). Por ejemplo, el mutante con eliminación de sitios principales unidos a O (Δ 129 Δ 139 o Δ 129 Δ 130 Δ 139) tenía niveles significativamente más altos de ácidos siálicos totales que el tipo silvestre; incluso
45 cuando se eliminaron cinco sitios unidos a O, la sialilación más alta todavía se podía ver en un mutante (Δ 129 Δ 130A133A136 Δ 139). Tres mutantes que muestran los contenidos totales más bajos de ácido siálico fueron A130A133A135A136A139, A129A133A135A136A139 y Δ 129 Δ 130A133A135A136 Δ 139.

50 Como no se detectó sialilación unida a O en estos tres mutantes (véase la siguiente sección), se consideró que el ácido siálico total contenía solo ácido siálico unido a N.

Para garantizar la funcionalidad, se midió la cinética de unión para cada mutante con CD80Ig y se encontró que era comparable a los patrones de referencia y de tipo silvestre. La eliminación de sitios únicos y múltiples unidos a O no tuvo un efecto significativo sobre la cinética de unión de CD80 en términos de las constantes de equilibrio y la
55 eficiencia de unión.

Glucoformas unidas a O

60 Glucosilación en sitios ocultos unidos a O

65 Como se muestra en la Figura 1B y 1C, el mapeo de péptidos solo identificó dos sitios principales unidos a O mientras que hay seis sitios predichos por el método de red neuronal computacional de O-glucosilación. Para revelar posibles sitios ocultos de glucosilación unidos a O, los sitios conocidos se alteraron mediante la eliminación de S129, S130 y S139. De forma interesante, el análisis de glucosilación unida a O demostró la existencia de sitios adicionales unidos a O (Figura 3C). Esto se confirmó aún más cuando se diseñó belatacept con mutaciones adicionales en las posiciones 133, 135 y 136; si bien este mutante podría sintetizarse, secretarse y unirse a CD80,

no produjo ninguna glucosilación unida a O (Fig. 3D).

Efecto de la secuencia vecina en la formación de O-glucoformas variables

5 La Figura 2 demostró que una sola mutación en la misma posición causó una variación significativa en el contenido total de ácido siálico. Para determinar la fuente de la variación, esos mutantes se analizaron adicionalmente para detectar O-glucoformas. Se encontró que la glucosilación unida a O de todos los mutantes estaba alterada en comparación con el tipo silvestre, y lo más interesante es que los patrones de glucosilación unida a O de estos mutantes eran diferentes entre sí (Fig. 4). Mediante la sustitución con glutamina en lugar de alanina, se generaron múltiples glucoformas que no se veían previamente en la proteína de tipo silvestre, mientras que la sustitución de alanina redujo el número de glucoformas. Esto indica que la O-glucosilación puede verse afectada por su secuencia vecina, dependiendo de qué aminoácido sea el marcador de posición. Además, cuando S129 o S130 se dejaron intactos y el resto de los cinco posibles sitios unidos a O se eliminaron mediante sustitución con alanina en cada sitio, no se pudo formar glucosilación unida a O (Fig. 4C), lo que respalda la importancia del microambiente en la formación de O-glucoformas a pesar de que no hay secuencias consenso de reconocimiento.

Especies de HMW

20 La agregación de proteínas se redujo mediante la eliminación de sitios unidos a O a través de sustitución o eliminación juzgada por una reducción significativa en la cantidad de especies de HMW en los productos proteicos. La mutación S129 o S139 causó una disminución en el porcentaje de especies de HMW que oscila entre el 8 % y el 29 %, mientras que la mutación causó una disminución del 60 % en HMW (Fig. 5). La eliminación de tres o más sitios de glucosilación unidos a O no mejoró aún más la reducción de HMW más allá de lo que se observó en los mutantes con doble eliminación.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Dali, Manisha

30

<120> MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGREGACIÓN DE GLUCOPROTEÍNAS

<130> 11797WOPCT

35

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40

<211> 1152

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Belatacept CTLA4Ig Mutante

<400> 1

ES 2 753 150 T3

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
 ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180
 acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
 gtccctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aaaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Belatacept CTLA4lg Mutante

10

<400> 2

ES 2 753 150 T3

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

ES 2 753 150 T3

```

                210                      215                      220
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225                      230                      235                      240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                245                      250                      255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                260                      265                      270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                275                      280                      285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
                290                      295                      300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305                      310                      315

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                325                      330                      335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                340                      345                      350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                355                      360                      365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                370                      375                      380

```

5 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región bisagra de IgG mutada con sitio de glucosilación unido a O en S129, S130, S139

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Ser5, Ser6, Ser15, sitios de glucosilación unidos a O

15 <400> 3

```

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1                      5                      10                      15

```

Ala Pro Glu

20 <210> 4

ES 2 753 150 T3

<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Región bisagra de IgG mutada con sitio de glucosilación unido a N en S129, S130, T133, T135, S136, S139

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Ser5, Ser6,Thr9,Thr11, Ser12, Ser15, sitios de glucosilación unidos a O

<400> 4

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu

15

<210> 5
<211> 28
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
20 25

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la agregación de glucoproteínas que comprende eliminar uno o más sitios de glucosilación unidos a O en las mismas, en donde la glucoproteína comprende la región bisagra de un dominio Fc y en donde los sitios de glucosilación unidos a O que se eliminarán están en dicha región bisagra.
2. El método de la reivindicación 1, en donde los sitios de glucosilación unidos a O se eliminan mediante sustitución y/o eliminación de aminoácidos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la región bisagra es una región bisagra de un dominio Fc mutado que se muestra en la SEQ ID NO: 4 y en donde el método comprende la sustitución y/o la eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O seleccionados de S129, S130, S136, S139, T133 y T135.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el método comprende la sustitución y/o la eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O seleccionados de S129 y S139.
5. El método de la reivindicación 3, en donde el método comprende la sustitución y/o la eliminación de los sitios de glucosilación unidos a O S129 y S139.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la glucoproteína comprende una proteína de fusión CTLA4Ig como se muestra en la Figura 6 y el método comprende la sustitución y/o la eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O seleccionados de S129 y S139.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la glucoproteína comprende una proteína de fusión CTLA4Ig como se muestra en la Figura 6 y el método comprende la sustitución y/o la eliminación de los sitios de glucosilación unidos a O S129 y S139.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la glucoproteína comprende una proteína de fusión CTLA4Ig como se muestra en la Figura 6 y el método comprende uno o más de los siguientes
 - a. la eliminación de la serina en la posición 129, o
 - b. el reemplazo de la serina en la posición 129 con ácido glutámico, o
 - c. la serina en la posición 129 se reemplaza con alanina, o
 - d. la eliminación de la serina en la posición 139, o
 - e. el reemplazo de la serina en la posición 139 con ácido glutámico, o
 - f. el reemplazo de la serina en la posición 139 con alanina, o
 - g. la eliminación de la serina en las posiciones 129 y 139, o
 - h. el reemplazo de la serina en la posición 129 con un ácido glutámico y el reemplazo de la serina en la posición 139 con una alanina, o
 - i. la eliminación de la serina en las posiciones 129, 130 y 139, o
 - j. la eliminación de la serina en las posiciones 129, 130 y 139, y el reemplazo de la serina en la posición 136 con una alanina, o
 - k. la eliminación de la serina en las posiciones 129, 130 y 139, y el reemplazo de la treonina en 133 y la serina en la posición 136 con una alanina, o
 - l. el reemplazo de la serina en las posiciones 130, 136 y 139 y la treonina en las posiciones 133 y 135 con una alanina, o
 - m. el reemplazo de la serina en las posiciones 129, 136 y 139 y la treonina en las posiciones 133 y 135 con una alanina, o
 - n. la eliminación de la serina en las posiciones 129, 130 y 139, el reemplazo de la treonina en las posiciones 133 y 135 y la serina en la posición 136 con una alanina.
9. Una región bisagra como se muestra en la SEQ ID NO: 4 que comprende la sustitución y/o eliminación de al menos uno de los sitios de glucosilación unidos a O seleccionados de S129, S130, S136, S139, T133, T135.
10. Una proteína de fusión CTLA4Ig como se muestra en la Figura 6, en donde al menos uno de los sitios de glucosilación unido a O seleccionado entre S129 y S139 está sustituido y/o eliminado.
11. La proteína de fusión CTLA4Ig de la reivindicación 10, en donde los sitios de glucosilación unidos a O S129 y S139 están sustituidos y/o eliminados.
12. Una proteína de fusión CTLA4Ig como se muestra en la Figura 6, en donde
 - a. la serina en la posición 129 se elimina,
 - b. la serina en la posición 129 se reemplaza con ácido glutámico,
 - c. la serina en la posición 129 se reemplaza con alanina,
 - d. la serina en la posición 139 se elimina,

ES 2 753 150 T3

- e. la serina en la posición 139 se reemplaza con ácido glutámico,
- f. la serina en la posición 139 se reemplaza con alanina
- g. la serina en la posición 129 y 139 se elimina,
- 5 h. la serina en la posición 129 se reemplaza con un ácido glutámico y la serina en la posición 139 se reemplaza con una alanina,
- i. la serina en las posiciones 129, 130 y 139 se elimina,
- j. la serina en las posiciones 129, 130 y 139 se elimina, y la serina en la posición 136 se reemplaza con una alanina,
- 10 k. la serina en las posiciones 129, 130 y 139 se elimina, y la treonina en 133 y la serina en la posición 136 se reemplazan con una alanina,
- l. la serina en las posiciones 130, 136 y 139 y la treonina en las posiciones 133 y 135 se reemplazan con una alanina,
- m. la serina en las posiciones 129, 136 y 139 y la treonina en las posiciones 133 y 135 se reemplazan con una alanina, o
- 15 n. la serina en las posiciones 129, 130 y 139 se elimina, la treonina en las posiciones 133 y 135 y la serina en la posición 136 se reemplazan con una alanina.

FIG. 1

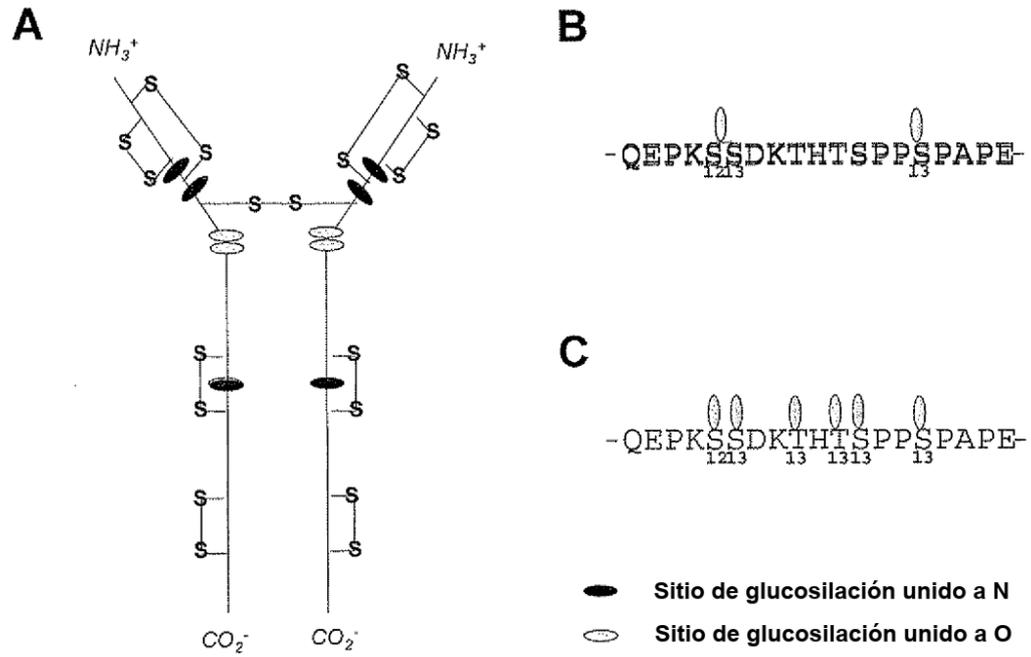


FIG. 2

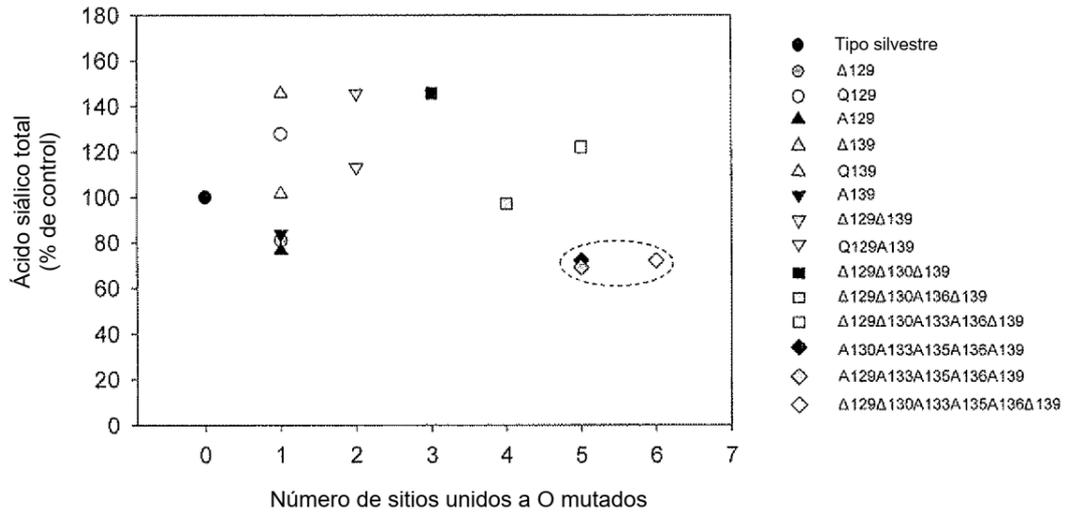


Fig 3

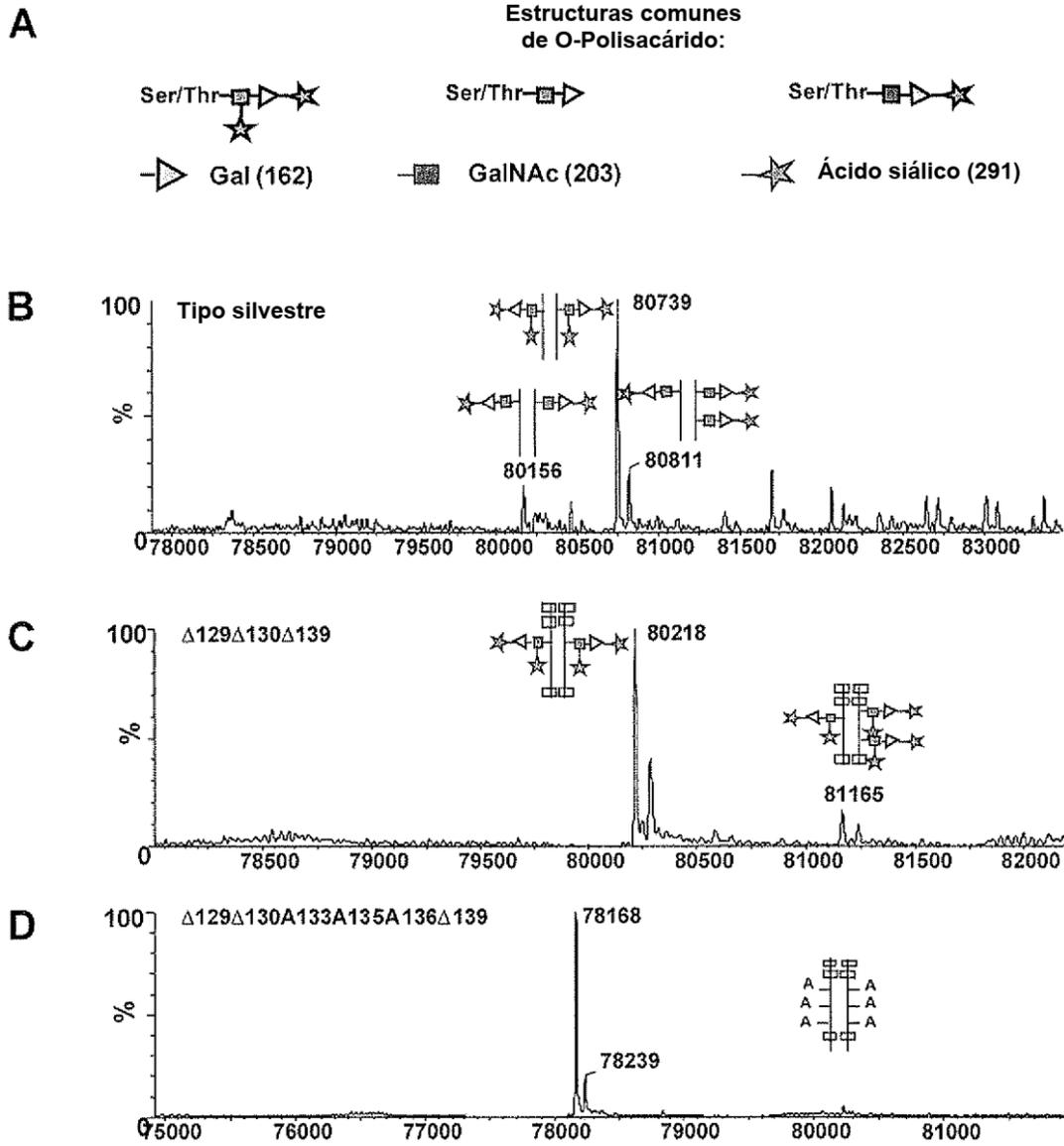


Fig 4

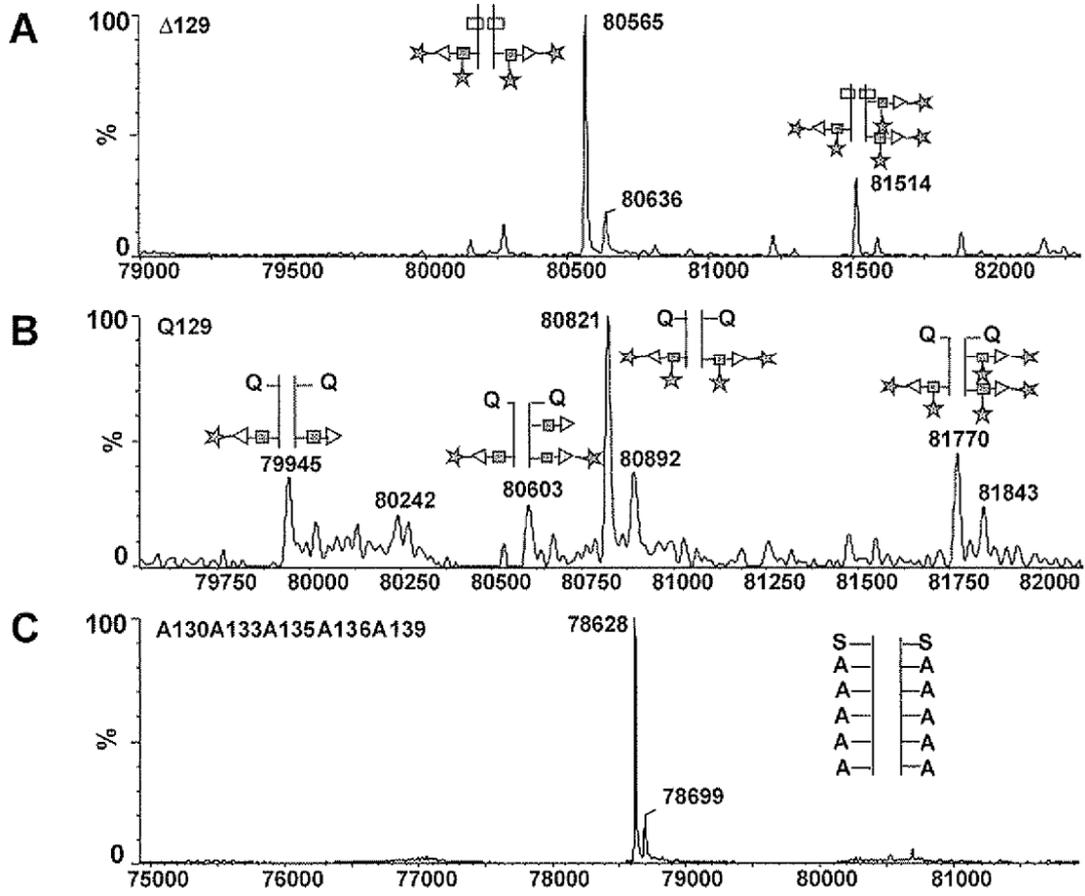


Fig. 5

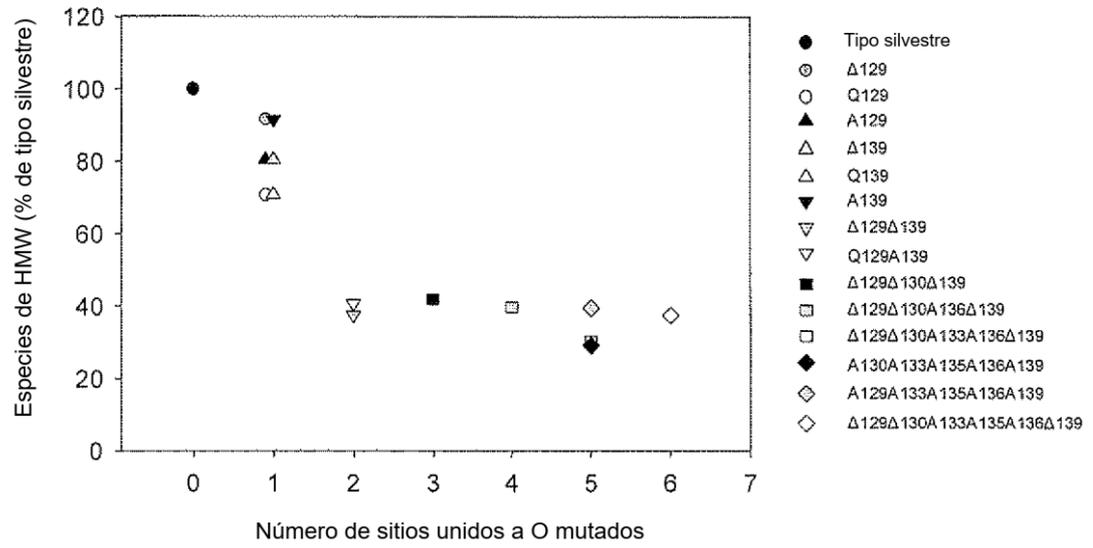


Fig. 6

ATGGGTGTAAGTCTCACACAGAGGACGCTGCTCACTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--F--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCAGGATTCGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCACCGTCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTCCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCRAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGACGCGGAGAACTACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACACCACTACACCCAGAGACCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
F--G--K--*	