

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 882**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2000 E 10180034 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **22.07.2020 EP 2270147**

54 Título: **Procedimiento para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional**

30 Prioridad:

**09.04.1999 JP 10315899**

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

**07.06.2021**

73 Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)  
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku  
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**HANAI, NOBUO;  
NAKAMURA, KAZUYASU;  
SHOJI, EMI;  
YAMASAKI, MOTOO;  
UCHIDA, KAZUHISA;  
SHINKAWA, TOYOHIDE;  
IMABEPPU, SUSUMU;  
KANDA, YUTAKA;  
YAMANE, NAOKO y  
ANAZAWA, HIDEHARU**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 601 882 T5

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional

5 **Campo técnico**

La presente exposición se refiere a un procedimiento para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional, tal como un anticuerpo, una proteína o un péptido, un agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional, y una molécula inmunofuncional que tiene la actividad estimulada.

10

**Técnica anterior**

Dado que los anticuerpos tienen gran actividad de unión, especificidad de unión y gran estabilidad en la sangre, se han intentado sus aplicaciones al diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas enfermedades humanas (*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Wiley-Liss, Inc., capítulo 2.1 (1995)). Sin embargo, un anticuerpo proveniente de un animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón, es reconocido como un material extraño cuando se administra a un ser humano, que de ese modo produce un anticuerpo humano contra el anticuerpo de ratón (anticuerpo humano antirratón: denominado en adelante "HAMA") en el cuerpo humano, y se sabe que el HAMA provoca efectos secundarios por reacción con el anticuerpo de ratón administrado (*J. Clin. Oncol.*, 2, 881 (1984); *Blood*, 65, 1349 (1985); *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 932 (1988); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 1242 (1985)), provoca la desaparición del anticuerpo de ratón administrado en la sangre (*J. Nuc. Med.*, 26, 1011 (1985); *Blood*, 65, 1349 (1985); *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 937 (1988)) y reduce los efectos de diagnóstico, preventivos y terapéuticos del anticuerpo de ratón (*J. Immunol.*, 135, 1530 (1985); *Cancer Res.*, 46, 6489 (1986)).

15

20

25

30

35

40

45

50

A fin de resolver estos problemas, se ha intentado convertir un anticuerpo proveniente de un animal no humano en un anticuerpo humanizado, tal como un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo con región determinante de complementariedad injertada humano (denominada en adelante "RDC"), utilizando técnicas de recombinación génica. El anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo en el que su región variable del anticuerpo (denominada en adelante "región V") es de un anticuerpo de un animal no humano y su región constante (denominada en adelante "región C") es de un anticuerpo humano (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 6851 (1984)). Se ha publicado de que la administración de dichos anticuerpos híbridos a seres humanos elimina efectos secundarios graves y la vida media en la sangre se prolongaba aproximadamente 6 veces en comparación con un anticuerpo de ratón (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 4220 (1989)). El anticuerpo humano injertado en la RDC es un anticuerpo en el que RDC de un anticuerpo humano se sustituye por la RDC de un anticuerpo no humano (*Nature*, 321, 522 (1986)). Se ha informado que, en una experimentación utilizando mono, la inmunogenicidad de un anticuerpo humano injertado en la RDC se redujo y su vida media en la sangre se prolongó 4 a 5 veces en comparación con un anticuerpo de ratón (*J. Immunol.*, 147, 1352 (1991)). Estas publicaciones demuestran que un anticuerpo humanizado es de esperar que tenga suficientes efectos, como un anticuerpo que ha de aplicarse al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades humanas, aun cuando no sea un anticuerpo completamente humano. En realidad, se han realizado pruebas clínicas con anticuerpos antitumorales, tales como un anticuerpo híbrido humano anti-CD20, Rituxan (IDEC, Inc.), y un anticuerpo humano injertado en la RDC anti-HER2/neu, Herceptin (Genentech, Inc.). Los efectos de seguridad y terapéuticos del anticuerpo híbrido humano anti-CD20 y del anticuerpo humano injertado en la RDC anti-HER2/neu, hasta un cierto grado, se han confirmado en el linfoma B y cáncer de mama, respectivamente (*J. Clin. Oncol.*, 16, 2825 (1998); *J. National Cancer Institute*, 90, 882 (1998)). Por otra parte, un fragmento (Fab') de un anticuerpo híbrido humano anti-GPIIb/IIIa, ReoPro (Centocor, Inc.), está comercializado en Europa y América como fármaco para la prevención de una enfermedad secundaria después de angioplastia coronaria transluminal percutánea. Actualmente, un gran número de ensayos clínicos se están realizando con otros anticuerpos humanizados. La mayoría de estos anticuerpos humanizados se han preparado utilizando técnicas de recombinación génica y se han producido utilizando células animales apropiadas.

55

60

Se ha puesto de manifiesto que cinco clases de anticuerpos, es decir, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, están presentes en los mamíferos. Los anticuerpos de clase IgG humana se utilizan principalmente en el diagnóstico, prevención y tratamiento de varias enfermedades humanas, debido a su larga vida media en la sangre y a características funcionales, tales como varias funciones efectoras y similares (*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Wiley-Liss, Inc., capítulo 2.1 (1995)). El anticuerpo humano de clase IgG se clasifica en los siguientes 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Un gran número de estudios se han llevado a cabo hasta ahora para la actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (denominada en adelante "actividad de ADCC") y la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (denominada en adelante "CDC") como funciones efectoras del anticuerpo de clase IgG, y se ha publicado de que los anticuerpos de la subclase IgG1 tienen la mayor actividad de ADCC y actividad de CDC entre los anticuerpos humanos de la clase IgG (*Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)). Por lo tanto, la mayor parte de los anticuerpos humanizados antitumorales que requieren una alta función efectora son anticuerpos de la subclase IgG1 humana, incluyendo Rituxan y Herceptin anteriores.

65

La expresión de la actividad de ADCC y actividad de CDC de los anticuerpos de la subclase IgG1 humana requiere la unión de la región Fc del anticuerpo a un receptor de anticuerpo existente en la superficie de una célula efectora,

tal como un linfocito citolítico, un linfocito citolítico natural, un macrófago activado o similar (denominado en adelante "FcγR") y diferentes componentes del complemento. Se ha sugerido que varios restos de aminoácidos en el segundo dominio de la región bisagra del anticuerpo y la región C (en adelante denominada "dominio Cγ2") (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) y una cadena de azúcar unida al dominio Cγ2 también son importantes para esta reacción de unión (Chemical Immunology, 65, 88 (1997)). En cuanto a la cadena de azúcar, Boyd *et al.* han examinado los efectos de una cadena de azúcar en la actividad de ADCC y la actividad de CDC, al tratar un anticuerpo con RDC injertada humana, CAMPATH-1H (subclase IgG1 humana), producido utilizando células de ovario de hámster chino (célula CHO) o células NS0 de mieloma de ratón con varias enzimas hidrolizantes de azúcar, y publicó que la eliminación de ácido siálico del terminal no reductor no tiene influencia sobre ambas actividades. Además la eliminación del resto de galactosa sin embargo se publicó que ejerce influencia en sólo la actividad de CDC, disminuyendo aproximadamente el 50% de su actividad. Se publicó que la eliminación completa de la cadena de azúcar que causa la desaparición de ambas actividades (Molecular Immunol., 32, 1311 (1995)). Por otra parte, Lifely *et al.* han analizado la cadena de azúcar de un anticuerpo con RDC injertada humana, CAMPATH-1H (subclase IgG1 humana) que se produjo utilizando células CHO, células NS0 o células YO de mieloma de rata, se determinó su actividad de ADCC y se publicó que el CAMPATH-1H proveniente de las células YO presenta la mayor actividad de ADCC, lo que sugiere que *N*-acetilglucosamina en la posición bisectriz es importante para la actividad (Glycobiology, 5, 813 (1995): documento WO 99/54342). Rothman *et al.* (Mol Immunol, 1989, 26:1113-1123) informan de que los inhibidores de la glucosilación afectan a la actividad de anticuerpo en unas condiciones determinadas. Estas publicaciones demuestran que la estructura de la cadena de azúcar desempeña una función importante en la función efectora de los anticuerpos de la subclase IgG1 humana, y que puede ser posible preparar un anticuerpo con mayor función efectora cambiando la estructura de cadena de azúcar. En realidad, sin embargo, las estructuras de las cadenas de azúcar son complejas y varían en gran medida. Resulta necesario por lo tanto estudiar más a fondo la estructura para obtener una función efectora mayor.

### Descripción de la exposición

Un objetivo de la presente descripción es especificar una cadena de azúcar que aumenta la actividad de ADCC, analizando las cadenas de azúcar de los anticuerpos de la subclase IgG1 humana producidos por varias células animales, y por lo tanto también proporcionar un procedimiento para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional. Dado que la actividad de ADCC mejora en dichos anticuerpos, el aumento en el efecto terapéutico de varias enfermedades humanas se puede esperar utilizando no sólo de anticuerpos antitumorales, sino también otros anticuerpos contra enfermedades, así como proteínas o péptidos contra varias enfermedades. En particular, en la aplicación clínica de anticuerpos antitumorales, el efecto antitumoral de un anticuerpo solo es insuficiente en muchos de los casos actuales. Las insuficiencias de anticuerpos conocidos han requerido la utilización simultánea de la quimioterapia (Science, 280, 1197, 1998). La dependencia de la quimioterapia sin embargo se reducirá, con una reducción de los efectos secundarios, si se proporciona un efecto antitumoral más fuerte de un anticuerpo solo por la mejora de la actividad de ADCC. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de diversos anticuerpos humanizados de la subclase IgG1 humana producida por dos tipos de células de ovario de hámster chino, células CHO/dhFr (ATCC CRL 9096) y células CHO/DG44 (Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555 (1986)), células NS0 de mieloma de ratón (RCB 0213, BIO/TECHNOLOGY, 10, 169 (1992)), células SP2/0-Ag14 de mieloma de ratón (denominadas en adelante células "SP2/0"; ATCC CRL 1581) y células de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (denominadas en adelante células "YB2/0"; ATCC CRL 1662) y han descubierto, como resultado, que la actividad de ADCC de un anticuerpo humanizado producido por las células YB2/0 de mieloma de rata es considerablemente mayor que la de los anticuerpos humanizados producidos por otras células. Además, como resultado de una evaluación de la actividad *in vivo* utilizando *Macaca fascicularis*, se ha descubierto que el anticuerpo humanizado producido por células YB2/0 presenta el efecto mayor, lo que sugiere la utilidad de un anticuerpo que tiene actividad de ADCC elevada en una aplicación clínica humana. Además, una cadena de azúcar con capacidad de aumentar la actividad de ADCC se ha identificado mediante el análisis y la comparación de las estructuras de las cadenas de azúcar de los anticuerpos humanizados producidos por varias células animales en detalle, y la presente invención se ha logrado.

Más específicamente, la presente exposición se refiere a los puntos (1) a (12) siguientes.

- [1]. Procedimiento para controlar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una mezcla de anticuerpos IgG F0, F1 y F2 en una célula anfitriona, animal no humano o planta, comprendiendo dicho procedimiento regular la presencia o ausencia de unión de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor (1) de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido de tipo complejo biantenaria eliminando un gen que codifica una  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa en la célula anfitriona, animal no humano o planta, o añadiendo una mutación al gen para reducir o eliminar la actividad enzimática en la célula anfitriona, animal no humano o planta,

en el que dicha cadena de azúcar se une a dichos anticuerpos y presenta principalmente la estructura siguiente:





- (3) Procedimiento para mejorar la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende unir una cadena de azúcar en la que la fucosa no está presente en *N*-acetilglucosamina del terminal reductor de una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido a la molécula inmunofuncional.

- 5 (4) Procedimiento según el punto (3), en el que la cadena de azúcar comprende:



- 10 (5) Procedimiento según el punto (3), en el que la cadena de azúcar se sintetiza en una célula que tiene una baja actividad enzimática de la adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor o no tiene dicha actividad enzimática.

- (6) Procedimiento según el punto (5), en el que la enzima que añade fucosa a *N*-acetilglucosamina de la terminal reductor es una fucosiltransferasa.

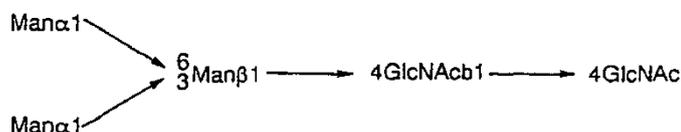
- 15 (7) Procedimiento según el punto (6), en el que la fucosiltransferasa es  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa.

- (8) Procedimiento según el punto (3), en el que la cadena de azúcar se sintetiza en una célula de mieloma de rata.

- 20 (9) Procedimiento según el punto (8), en el que la célula de mieloma de rata es YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL 1662).

- 25 (10) Procedimiento para inhibir la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende unir una cadena de azúcar en la que la fucosa está presente en *N*-acetilglucosamina del terminal reductor de una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido a una molécula inmunofuncional.

- (11) Procedimiento según el punto (10), en el que la cadena de azúcar comprende:



- 30 (12) Procedimiento según el punto (10), en el que la cadena de azúcar se sintetiza en una célula que tiene una gran actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor.

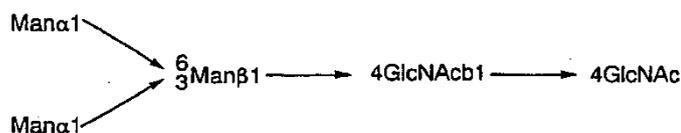
- 35 (13) Procedimiento según el punto (12), en el que la enzima que añade fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor es una fucosiltransferasa.

- (14) Procedimiento según el punto (13), en el que la fucosiltransferasa es  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa.

- 40 (15) Procedimiento según el punto (1) a (14), en el que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.

- 45 (16) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende una cadena de azúcar en la que la fucosa no está presente en *N*-acetilglucosamina del terminal reductor de una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido.

- (17) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (16), en el que la cadena de azúcar comprende:



- 50 (18) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (16), en el que la cadena de azúcar se sintetiza en una célula que tiene una baja actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetil-glucosamina del terminal reductor o no tiene dicha actividad enzimática.

55

- (19) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (18), en el que la enzima que añade fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor es una fucosiltransferasa.
- 5 (20) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (19), en el que la fucosiltransferasa es  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa.
- (21) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (16), en el que la cadena de azúcar se sintetiza en una célula de mieloma de rata.
- 10 (22) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto (21), en el que la célula de mieloma de rata es YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL 1662).
- (23) Agente estimulante de la actividad de una molécula inmunofuncional según el punto uno cualquiera de (16) a (22), en el que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.
- 15 (24) Molécula inmunofuncional que tiene una actividad estimulada inmunofuncional, a la que está unida la molécula de una cadena de azúcar en la que la fucosa no está presente en *N*-acetilglucosamina del terminal reductor de una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido.
- 20 (25) Molécula inmunofuncional que tiene una actividad inhibida inmunofuncional a la que está unida la molécula de una cadena de azúcar en la que la fucosa está presente en *N*-acetilglucosamina del terminal reductor de una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido.
- 25 (26) Molécula inmunofuncional según el punto (24), en la que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.
- (27) Molécula inmunofuncional según el punto (25), en la que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.
- 30 (28) Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según el punto (24), que comprende la utilización de una célula que tiene una baja actividad enzimática de la adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor o no tiene dicha actividad enzimática.
- 35 (29) Procedimiento según el punto (28), en el que la enzima que añade fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor es una fucosiltransferasa.
- (30) Procedimiento según el punto (29), en el que la fucosiltransferasa es  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa.
- 40 (31) Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según el punto (24), en el que se utiliza una célula de mieloma de rata en el método para la producción de una molécula inmunofuncional que tiene una actividad inhibida inmunofuncional.
- (32) Procedimiento según el punto (31), en el que la célula de mieloma de rata es YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20.
- 45 (33) Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según el punto (25), en el que se utiliza una célula que tiene una alta actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor.
- 50 (34) Procedimiento según el punto (33), en el que la enzima que añade fucosa a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor es una fucosiltransferasa.
- (35) Procedimiento según el punto (34), en el que la fucosiltransferasa es  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa.
- 55 (36) Molécula inmunofuncional según el punto (26), en la que el anticuerpo reconoce un antígeno tumoral.
- Un antígeno tumoral utilizado según la presente invención es un antígeno que se expresa en una célula tumoral en mayor cantidad en comparación con las células normales. Los ejemplos incluyen gangliósido GD2, GD3 y GM2 (*Cancer Immunol. Immunother.*, 43, 152 (1996)), HER2 (*J. Surgical Research*, 11, 85 (1998)), CD52 (*Leukemia Research*, 22, 185 (1998)) y MAGE (*APMIS*, 106, 665 (1998)). Además, un factor que produce el crecimiento de una célula tumoral y su receptor son también antígenos tumorales. Los ejemplos incluyen un factor de crecimiento de fibroblastos básico y su receptor (*Pancreas*, 17, 169 (1998)) y un factor de crecimiento celular endotelial vascular y su receptor (*Pathology International*, 48, 499 (1998)).
- 60 (37) Molécula inmunofuncional según el punto (36), en la que el antígeno tumoral es gangliósido GD3.
- 65

(38) Molécula inmunofuncional según el punto (36), en la que 07/09/51 (FERM BP-6691) produce el anticuerpo.

(39) Molécula inmunofuncional según el punto (26), en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado con una alergia o inflamación.

5 Un antígeno relacionado con una alergia o inflamación utilizado según la presente invención es un antígeno que produce una alergia o inflamación y un antígeno que se produce acompañado por una alergia o inflamación. Los ejemplos incluyen la interleucina 5 y su receptor (*International Archives. Allergy. Immunol.*, 117, 11 (1998)), un factor de necrosis tumoral y su receptor (*Citokine*, 8, 651 (1996)).

10 (40) Molécula inmunofuncional según el punto (39), en la que el antígeno relacionado con una alergia o inflamación es la cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 5 humana.

15 (41) Molécula inmunofuncional según el punto (39), en la que el n° 3 (FERM BP-6690) produce el anticuerpo.

(42) Molécula inmunofuncional según el punto (26), en el que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado con una cardiopatía.

20 Un antígeno relacionado con una cardiopatía utilizado según la presente invención es un antígeno que está involucrado en una cardiopatía provocada por el trombo o restenosis vascular. Los ejemplos incluyen GPIIb/IIIa de plaquetas (*Thrombosis Research*, 89, 129 (1998)), un factor de crecimiento derivado de plaquetas y su receptor (*American J. Physiology*, 269, 1641 (1995)), un factor de coagulación de la sangre (*Thrombosis. Haemostasis*, 79, 14 (1998)) y similares.

25 (43) Molécula inmunofuncional según el punto (27), en el que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad autoinmunitaria.

30 Un antígeno relacionado con una enfermedad autoinmunitaria utilizado según la presente invención es un autoantígeno que provoca una respuesta inmunitaria como causa de una enfermedad y un antígeno que aumenta la respuesta. Los ejemplos incluyen auto-ADN (*Rheumatology International*, 17, 223 (1998)) y /CD4 (*Rheumatic Diseases Clinics. América del Norte*, 24, 567 (1998)).

35 (44) Molécula inmunofuncional según el punto (26), en el que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado con una infección vírica o bacteriana.

40 Un antígeno relacionado con una infección vírica o bacteriana utilizado según la presente invención es un antígeno relacionado con su infección y el crecimiento en una célula diana vírica o bacteriana y también incluye un producto vírico o bacteriano. Los ejemplos incluyen gp120 (*Virology*, 248, 394 (1998)), CXCR4 (*J. Virology*, 72, 8453 (1998)) y toxina Vero (*J. Clinical Microbiology*, 34, 2053 (1996)).

(45) Agente para el diagnóstico de un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según el punto (36) como principio activo.

45 (46) Agente para el tratamiento de un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según el punto (36) como principio activo.

(47) Agente para la prevención de un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según el punto (36) como principio activo.

50 (48) Agente para el diagnóstico de una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según el punto (39) como principio activo.

(49) Agente para el tratamiento de una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según el punto (39) como principio activo.

55 (50) Agente para la prevención de una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según el punto (39) como principio activo.

60 (51) Agente para el diagnóstico de una cardiopatía, que comprende el anticuerpo según el punto (42) como principio activo.

(52) Agente para el tratamiento de una cardiopatía, que comprende el anticuerpo según el punto (42) como principio activo.

65 (53) Agente para la prevención de una cardiopatía, que comprende el anticuerpo según el punto (42) como principio activo.

(54) Agente para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende el anticuerpo según el punto (43) como principio activo.

5 (55) Agente para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende el anticuerpo según el punto (43) como principio activo.

(56) Agente para la prevención de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende el anticuerpo según el punto (43) como principio activo.

10 (57) Agente para el diagnóstico de una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según el punto (44) como principio activo.

15 (58) Agente para el tratamiento de una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según el punto (44) como principio activo.

(59) Agente para la prevención de una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según el punto (44) como principio activo.

20 (60) Agente para el diagnóstico de varias enfermedades, que comprende el péptido o proteína según el punto (26) o (27) como principio activo.

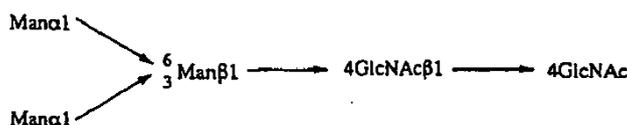
Ejemplos de las diversas enfermedades según la presente invención incluyen un cáncer, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una cardiovascular, una enfermedad autoinmunitaria, una infección vírica o bacteriana y similares.

25 (61) Agente para el tratamiento de varias enfermedades, que comprende el péptido o proteína según el punto (60) como principio activo.

30 (62) Agente para la prevención de varias enfermedades, que comprende el péptido o proteína según el punto (60) como principio activo.

Basándose en la forma de unión de moléculas inmunofuncionales, la cadena de azúcar se clasifica a grandes rasgos en dos tipos, a saber, una cadena de azúcar que se une a la asparagina (denominada cadena de azúcar unida a *N*-glucósido) y una cadena de azúcar que se une a la serina, treonina y similares (denominada cadena de azúcar unida a *O*-glucósido).

40 La cadena de azúcar unida a *N*-glucósido según la presente invención presenta varias estructuras (*Biochemical Experimentation Method 23 - Method for Studying Glycoprotein Sugar Chains* (Gakkai Shuppan Center), editado por Reiko Takahashi (1989)), pero cada caso tiene la siguiente estructura de núcleo básico común.



45 En la estructura anterior, el terminal de la cadena de azúcar que se une a la asparagina se denomina terminal reductor, y el lado opuesto se denomina terminal no reductor. La fucosa puede unirse a *N*-acetilglucosamina del terminal reductor, por ejemplo, por un enlace  $\alpha$ -1,3 o un enlace  $\alpha$ 1,6.

50 Los ejemplos de cadenas de azúcar unidas a *N*-glucósido incluyen un tipo rico en manosa, en el que sólo manosa se une al terminal no reductor de la estructura del núcleo; un tipo complejo, en el que el lado del terminal no reductor de la estructura del núcleo tiene una o más ramificaciones de galactosa-*N*-acetilglucosamina (denominado en adelante "Gal-GlcNAc") y el lado del terminal no reductor de Gal-GlcNAc tiene además una estructura tal como por ejemplo un ácido siálico o bisecando *N*-acetilglucosamina; un tipo híbrido, en el que el lado del terminal no reductor de la estructura del núcleo tiene ambas ramas de la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido rico en manosa y cadena de azúcar compleja unida al *N*-glucósido.

55 Una cadena de azúcar en la que la fucosa se une a la *N*-acetilglucosamina del lado de extremo terminal es incluida en la totalidad de estos tipos, y la cadena de azúcar de la presente invención incluye no únicamente las cadenas de azúcar anteriores sino asimismo cualquier otra cadena de azúcar, siempre y cuando la fucosa no esté unida a la *N*-acetilglucosamina.

60 Una molécula inmunofuncional es una molécula que procede originalmente del cuerpo vivo y está implicada en varias respuestas inmunitarias. En concreto, incluye por ejemplo anticuerpos, proteínas y péptidos.

- 5 Un anticuerpo es una proteína que es producida *in vivo* por una respuesta inmunitaria como resultado de la estimulación por un antígeno extraño y tiene una actividad para unirse específicamente al antígeno. Los ejemplos del anticuerpo incluyen un anticuerpo segregado por una célula de hibridoma preparada a partir de células de bazo de un animal inmunizado después de la inmunización del animal con un antígeno, así como un anticuerpo preparado por técnicas de recombinación génica, a saber un anticuerpo obtenido introduciendo un anticuerpo que codifica el vector de expresión del anticuerpo insertado en el gen en una célula anfitriona. Los ejemplos incluyen un anticuerpo producido por un hibridoma, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
- 10 Un hibridoma es una célula que produce un anticuerpo monoclonal que tiene una especificidad de antígeno deseada y se obtiene por fusión celular de un linfocito B preparado inmunizando un mamífero distinto del ser humano con un antígeno, con una célula de mieloma proveniente, por ejemplo de un ratón.
- 15 Los anticuerpos humanizados incluyen, por ejemplo, un anticuerpo híbrido humano y un anticuerpo injertado en una región determinante de complementariedad humana (denominada en adelante "RDC").
- 20 Un anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (en adelante, denominada también "HV" o "VH", en el que la cadena pesada es una cadena H y la región variable es una región V) y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (en adelante denominada también "LV" o "VL", en el que la cadena ligera es una cadena L) proveniente de un animal no humano, una región constante de cadena pesada (en adelante denominado también "CH", en el que la región constante es una región C) de un anticuerpo humano y una región constante de cadena ligera (en adelante denominado también "CL") de un anticuerpo humano. Los animales no humanos pueden ser, por ejemplo, cualquiera de entre ratón, rata, hámster y conejo, siempre y cuando pueda prepararse un hibridoma a partir de los mismos.
- 25 El anticuerpo híbrido humano puede producirse obteniendo los ADNc que codifican VH y VL de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, insertando cada uno de los ADNc en un vector de expresión para una célula anfitriona que tiene un gen que codifica la CH del anticuerpo humano y la CL de anticuerpo humano para construir un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano, y a continuación, introduciendo el vector en una célula anfitriona para expresar el anticuerpo.
- 30 Puede utilizarse cualquier CH del anticuerpo híbrido humano, siempre que pertenezca a una inmunoglobulina humana (denominado en adelante, "hlg"), pero se prefieren los de la clase hlgG y se puede utilizar cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tales como hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4. Por otra parte, puede utilizarse cualquier CL del anticuerpo híbrido humano, siempre que pertenezca a hlg, y se pueden utilizar los de la clase κ o la clase λ.
- 35 Un anticuerpo con RDC injertada humano es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de las RDC de la VH y VL de un anticuerpo proveniente de un animal no humano se injertan a las posiciones apropiadas de la VH y VL de un anticuerpo humano.
- 40 El anticuerpo con RDC injertada humano puede producirse construyendo los ADNc que codifican las regiones V en la que las secuencias de RDC de la VH y VL de un anticuerpo provenientes de un animal no humano se injertan a las secuencias de RDC de la VH y VL de un anticuerpo proveniente de un animal no humano se injertan cada una de las ADNc en un vector de expresión para una célula anfitriona que tiene un gen que codifica la CH de un anticuerpo humano y la CL de un anticuerpo humano para construir un vector de expresión del anticuerpo con RDC injertada humano, e introduciendo el vector de expresión en una célula anfitriona para expresar el anticuerpo con RDC injertada humano.
- 45 La CH del anticuerpo con RDC injertada humano puede ser cualquier región que pertenezca a la hlg, pero se prefieren las de la clase hlgG. Cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tales como hlgG1, hlgG2, hlgG3, y hlgG4 se pueden utilizar. Además, la CL del anticuerpo con RDC injertada humano puede ser cualquier región que pertenezca a hlg, y pueden utilizarse los de clase κ o la clase λ.
- 50 Un anticuerpo humano tiene que ser originalmente un anticuerpo existente de forma natural en el cuerpo humano, sino que también incluye anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de fagos de anticuerpo humano y de un animal transgénico que produce anticuerpos humanos o de una planta transgénica que produce anticuerpos humanos, que se preparan basándose en avances recientes en ingeniería genética, ingeniería celular y técnicas de ingeniería de desarrollo.
- 55 El anticuerpo existente en el cuerpo humano puede obtenerse, por ejemplo, aislando un linfocito de la sangre periférica humana, immortalizando mediante su infección con el virus EB, seguido de clonación, cultivando un linfocito capaz de producir el anticuerpo, y purificando el anticuerpo de la mezcla de cultivo.
- 60 La biblioteca de fagos de anticuerpo humano es una biblioteca en la que un fragmento de anticuerpo, tales como por ejemplo Fab o un anticuerpo monocatenario, se expresa en la superficie del fago insertando un gen de
- 65

anticuerpo preparado a partir de linfocitos B humanos en un gen del fago. Un fago que expresa un fragmento de anticuerpo con la actividad de unión al antígeno deseado puede recuperarse de esta biblioteca, utilizando su actividad para unirse a un sustrato de antígeno inmovilizado como marcador. El fragmento de anticuerpo puede convertirse además en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

Un animal transgénico no humano que produce anticuerpos humanos es un animal en el que un gen que codifica anticuerpos humanos está integrado en las células. Concretamente, un animal transgénico que produce anticuerpos humanos se puede preparar introduciendo un gen que codifica anticuerpos humanos en una célula ES de ratón, trasplantando la célula ES dentro de un embrión en la fase temprana de otro ratón y desarrollando un animal. El anticuerpo humano puede prepararse y acumularse en una mezcla de cultivo del animal transgénico que produce anticuerpos humanos obteniendo un hibridoma que produce anticuerpos humanos según un procedimiento de preparación de hibridomas llevado a cabo generalmente en mamíferos no humanos y a continuación cultivando el hibridoma.

Una actividad de los anticuerpos de la presente exposición incluye la actividad de ADCC.

La actividad de ADCC, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una actividad para dañar, por ejemplo, una célula tumoral mediante la activación de una célula efectora por la unión de la región Fc de un anticuerpo a un receptor de Fc existente en la superficie de una célula efectora tal como un linfocito citolítico, un linfocito citolítico natural o un macrófago activado (*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Wiley-Liss, Inc., capítulo 2.1 (1995)).

Se puede utilizar cualquier proteína y péptido, siempre y cuando se puedan activar varias respuestas inmunitarias. Los ejemplos incluyen moléculas de interferón, tales como la interleuquina-2 (IL-2) (*Science*, 193, 1007 (1976)) y la interleucina-12 (IL-12) (*J. Leuc. Biol.*, 55, 280 (1994)), factores estimulantes de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (*J. Biol. Chem.*, 258, 9017 (1983)), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (*J. Exp. Med.*, 173, 269 (1992)) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (*J. Biol. Chem.*, 252, 1998 (1977)); factores de crecimiento, tales como eritropoyetina (EPO) (*J. Biol. Chem.*, 252, 5558 (1977)) y trombopoyetina (TPO) (*Nature*, 369, 533 (1994)).

Las actividades de los anticuerpos de la presente invención son las actividades de diversas células inmunocompetentes, incluyendo los linfocitos (por ejemplo, linfocitos T y linfocitos B) y los macrófagos, o diversas reacciones de respuesta inmunitaria, cuando la proteína y el péptido que contienen la cadena de azúcar se administran en la cuerpo vivo.

La estimulación de las actividades de los anticuerpos de la presente invención incluye la activación de linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T por IL-2 e IL-12, las actividades estimulantes de la producción de eritrocitos por EPO, que aumentan aún más.

#### 1. Procedimiento para el análisis de la cadena de azúcar de una molécula inmunofuncional

##### *(1) Análisis de la composición de azúcar neutro y aminoazúcar*

Como se describió anteriormente, la cadena de azúcar de la IgG comprende un azúcar neutro, tal como por ejemplo, galactosa, manosa o fucosa, un aminoazúcar, tal como, N-acetilglucosamina, y un azúcar ácido, tal como por ejemplo, ácido siálico.

En cuanto a análisis de la composición de la cadena de azúcar de un anticuerpo, la proporción en la composición puede analizarse mediante la liberación de azúcares neutros o aminoazúcares por hidrólisis ácida de la cadena de azúcar.

Métodos específicos incluyen un método que utiliza un analizador de la composición de azúcar (BioLC) producido por Dionex. El BioLC es un aparato para el análisis de la composición de azúcar por el método HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada) (*J. Liq. Chromatogr.*, 6, 1577 (1983)).

La proporción en la composición puede analizarse también por un método de marcaje de fluorescencia utilizando 2-aminopiridina. Concretamente, la proporción en la composición se puede calcular por marcaje de fluorescencia de una muestra hidrolizada con ácido con 2-aminopiridina según un método conocido (*Agric. Biol. Chem.*, 55 (1), 283-284 (1991)) y llevando a cabo el análisis por HPLC.

##### *(2) Análisis de la estructura de la cadena de azúcar*

La estructura de la cadena de azúcar de un anticuerpo puede analizarse por un método de cartografía de la cadena de azúcar en dos dimensiones (*Anal. Biochem.*, 171, 73 (1988), *Biochemical Experimentation Method 23 - Method*

for Studying Glycoprotein Sugar Chains (Gakkai Shuppan Center (Gakkai Shuppan Center), editado por Reiko Takahashi (1989)). El método de cartografía de la cadena de azúcar en dos dimensiones es un método en el que se estima la estructura de la cadena de azúcar, por ejemplo, representando el tiempo de retención o la posición de elución de la cadena de azúcar por cromatografía en fase inversa en el eje X y el tiempo de retención o la posición de elución de la cadena de azúcar por una cromatografía en fase normal en el eje Y, y comparando los resultados con los de las cadenas de azúcar conocidas.

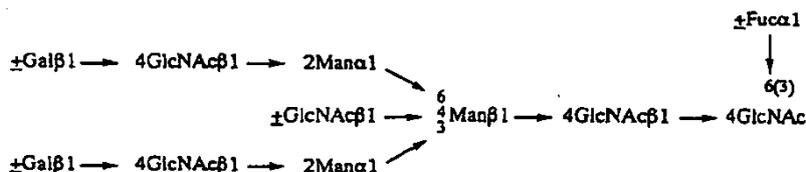
Concretamente, la cadena de azúcar se libera del anticuerpo por hidrazinolisis del anticuerpo, se lleva a cabo marcaje de fluorescencia de la cadena de azúcar con 2-aminopiridina (denominada en adelante "PA") (*J. Biochem.*, 95, 197 (1984)), y a continuación, la cadena de azúcar se separa de un exceso de reactivo de PA por filtración en gel y se sometió a cromatografía en fase inversa. Posteriormente, cada pico de la cadena de azúcar fraccionada se analiza por cromatografía en fase normal. Basándose en estos resultados, puede estimarse la estructura de la cadena de azúcar mediante el trazado de los puntos en una cartografía en dos dimensiones de la cadena de azúcar y comparándolos con los de los patrones de la cadena de azúcar (preparado por Takara Shuzo) o una referencia (*Anal. Biochem.*, 171, 73 (1988)).

Además, la estructura estimada por el método de cartografía de cadena de azúcar en dos dimensiones se puede confirmar por espectrometría de masas, tal como por ejemplo MALDI-TOF-MS, de cada cadena de azúcar.

## 2. Método para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional

El método de la presente invención para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional se describe a continuación utilizando inmunoglobulina G (denominada en adelante, "IgG") como ejemplo.

La cadena de azúcar unida al *N*-glucósido que se une a la IgG es una cadena de azúcar compleja biantenaria compuesto principalmente la siguiente estructura (denominado en adelante "biantenario").



La presente invención también incluye las cadenas de azúcar similares en las que un azúcar ácido, ácido siálico, se añade además a Gal del terminal no reductor de la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido o a una *N*-acetilglucosamina bisectriz se añade a la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido.

En un tipo IgG, una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido se une a una posición en la región Fc. Dado que un tipo IgG comprende dos cadenas H, el resto Fc está presente en dos posiciones en una molécula de anticuerpo. Por consiguiente, la región de unión de la cadena de azúcar también está presente en dos posiciones.

La actividad de IgG cambia en función del número de cadenas de azúcar unidas al *N*-glucósido en las que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina, para añadirse a las dos regiones de unión de la cadena de azúcar anterior. Es decir, cuando la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a por lo menos una de las regiones de unión de la cadena de azúcar, aumenta la actividad de la molécula inmunofuncional. Como ejemplo, el grado de actividad de IgG será la siguiente: anticuerpo F0 > anticuerpo F1 > anticuerpo F2, en el que el anticuerpo F0 designa un anticuerpo en el que la cadena de azúcar unida a *N*-glucósido en el que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a las dos regiones de unión a las cadenas de azúcar; el anticuerpo F1 designa un anticuerpo en el que la cadena de azúcar unida a *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a una de las regiones de unión de la cadena de azúcar, y el anticuerpo F2 designa un anticuerpo en el que la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a ambas regiones de unión de la cadena de azúcar.

El anticuerpo producido no siempre puede tener una sola estructura de cadena de azúcar, y el anticuerpo F0, el anticuerpo F1 y el anticuerpo F2 puede estar presente como una mezcla cuando se tiene en cuenta la presencia o ausencia de fucosa. Para controlar la actividad de ADCC del anticuerpo producido, la cadena de azúcar unida al anticuerpo se analiza utilizando el método anterior para analizar la cadena de azúcar de una molécula inmunofuncional, y utilizando el resultado analizado como índice.

La actividad de ADCC del anticuerpo producido puede estimularse aumentando de la relación existente entre el anticuerpo F1 y el anticuerpo F0. Concretamente, el anticuerpo F1 y el anticuerpo F0 pueden purificarse, o la expresión en una célula anfitriona pueden regularse de tal manera que la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a la molécula inmunofuncional.

La actividad de ADCC del anticuerpo producido puede inhibirse aumentando la proporción existente del anticuerpo

F2. Concretamente, el anticuerpo F2 puede purificarse, o la expresión en una célula anfitriona puede regularse de tal manera que la cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa está unida a *N*-acetilglucosamina se añade a la molécula inmunofuncional.

- 5 Como se describió anteriormente, la fuerza de la actividad deseada puede controlarse regulando la proporción existente de anticuerpo F0, anticuerpo F1 y anticuerpo F2.

### 3. Procedimiento para la producción de una molécula inmunofuncional

10 Se describe a continuación un procedimiento para producir una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina o una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido en la que la fucosa está unida a *N*-acetilglucosamina.

15 Para unir una cadena deseada de azúcar a un anticuerpo, un péptido o una proteína, puede producirse introduciendo un gen que codifica el anticuerpo, péptido o proteína de interés en una célula anfitriona y cultivando la célula resultante. Alternativamente, también puede producirse introduciendo un gen que codifica el anticuerpo, péptido o proteína de interés en un animal o un vegetal y cultivando el animal o vegetal resultante.

20 La célula anfitriona, animal o vegetal útil en la producción de una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina puede ser cualquier célula, animal o vegetal, siempre y cuando, por ejemplo, tenga baja actividad enzimática de adición de fucosa a la *N*-acetilglucosamina que se une a la región Fc de un anticuerpo o no tiene actividad enzimática. Ejemplos de la célula que tiene baja actividad enzimática de la adición de fucosa a la *N*-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática incluyen, por ejemplo, una célula de mieloma de rata, célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag. 20 (ATCC CRL 1662 (denominada en adelante "célula YB2 / 0")).

25 También, se puede construir una célula, animal o vegetal que tiene una actividad enzimática baja o ninguna asociada a un enlace  $\alpha$ 1,6, por ejemplo, suprimiendo un gen que codifica la enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 en la célula anfitriona, animal o vegetal o añadiendo una mutación al gen para reducir o eliminar la actividad enzimática, y se puede utilizar como célula anfitriona, animal o vegetal. La enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 incluye fucosiltransferasas, y preferentemente es  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa (denominada en adelante "FUT8").

30 La célula anfitriona, animal o vegetal que se utiliza en la producción de una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido en la que la fucosa está unida a *N*-acetilglucosamina puede ser cualquier célula, animal o vegetal, siempre y cuando, por ejemplo, tenga una alta actividad enzimática de adición de fucosa a la *N*-acetilglucosamina que se une a la región Fc de un anticuerpo.

35 Además, una célula, animal o vegetal que tiene una alta actividad enzimática asociada a un enlace  $\alpha$ 1,6 se puede preparar introduciendo un gen que codifica la enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 en la célula anfitriona, animal o vegetal o añadiendo una mutación al gen para aumentar la actividad enzimática, y se puede utilizar como célula anfitriona, animal o vegetal. La enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 incluye fucosiltransferasas, y es preferentemente FUT8.

40 Las células anfitrionas pueden ser, por ejemplo, cualquiera de entre bacterias, levaduras, células animales, células de insectos, células vegetales y similares, siempre que puedan expresar el gen de interés.

45 Ejemplos de células anfitrionas bacterianas incluyen microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*, al género *Serratia*, al género *Bacillus*, al género *Brevibacterium*, al género *Corynebacterium*, al género *Microbacterium*, y al género *Pseudomonas*, tales como *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* n° 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* GI698, *Escherichia coli* TB1, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas* sp. D-0110.

50 Los ejemplos de células anfitrionas de levadura incluyen los microorganismos que pertenecen al género *Saccharomyces*, al género *Schizosaccharomyces*, al género *Kluyveromyces*, al género *Trichosporon*, al género *Schwanniomyces*, al género *Pichia*, al género *Candida*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius* y *Candida utilis*.

65 Los ejemplos de células anfitrionas de animales incluyen células de mieloma de ratón, tales como las células NS0

y las células SP2/0, células de ovario de hámster chino, tales como las células CHO/dhfr y las células CHO/DG44; células de mieloma de rata, tales como las células YB2/0 y las células IR983F; células de mono, tales como las células COS, células de mieloma humano, tales como las células Namalwa. Preferentemente, pueden utilizarse las células de ovario de hámster chino, tales como células CHO/DG44.

5 Los ejemplos de células anfitrionas de insecto incluyen células de ovario de *Spodoptera frugiperda*, tales como Sf9 y Sf21 (*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992)); una célula de ovario de *Trichoplusia ni*, tal como High 5 (preparada por Invitrogen).

10 Ejemplos de células anfitrionas vegetales incluyen células vegetales de tabaco, patata, tomate, zanahoria, soja, colza, alfalfa, arroz, trigo y cebada.

Una molécula inmunofuncional puede producirse cultivando el transformante obtenido en un medio para formar y acumular la molécula inmunofuncional en el cultivo resultante, y a continuación recuperarla del cultivo.

15 Además, una molécula inmunofuncional también puede producirse mediante la construcción de un animal o una planta transgénicos y criando el animal o cultivando la planta resultantes.

20 El animal o vegetal para la producción de una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido en la que la fucosa no está unida a *N*-acetilglucosamina puede ser cualquier animal o planta, siempre y cuando, por ejemplo, tenga una baja actividad enzimática de adición de fucosa a la *N*-acetilglucosamina que se une a la región Fc de un anticuerpo o no tiene actividad enzimática.

25 También, un animal no humano transgénico o una planta transgénica que tiene una actividad enzimática baja o ninguna en relación con un enlace  $\alpha$ 1,6 puede prepararse y utilizarse suprimiendo un gen que codifica la enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 en el animal o vegetal o añadiendo una mutación al gen para reducir o eliminar la actividad enzimática. La enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 incluye fucosiltransferasas y preferentemente es FUT8.

30 Cualquier animal o vegetal puede utilizarse como animal o vegetal para su utilización en la producción de una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida al *N*-glucósido en la que la fucosa está unida a *N*-acetilglucosamina, siempre y cuando, por ejemplo, con respecto a un antígeno, tenga una alta actividad enzimática de adición de fucosa a la *N*-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo.

35 Además, un animal transgénico no humano o planta transgénica que tiene una alta actividad enzimática que lleva un enlace  $\alpha$ 1,6 puede prepararse y utilizarse introduciendo un gen que codifica la enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 en el animal o vegetal o añadiendo una mutación al gen para aumentar la actividad enzimática. La enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 incluye fucosiltransferasas y preferentemente es FUT8.

40 El animal no humano transgénico se puede obtener inyectando directamente un gen deseado en un huevo fecundado (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 7380 (1980)).

Los animales no humanos transgénicos incluyen, por ejemplo, ratón, rata, conejo, aves de corral, cabra o ganado vacuno.

45 Además, se puede conseguir un animal no humano transgénico o un animal no humano genéticamente modificado que tiene un gen deseado introduciendo el gen deseado en una célula madre embrionaria y preparando el animal por un método híbrido de agregación o un método híbrido de inyección (*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993); *Biomaterial Series 8*, Gene Targeting, Gene Targeting, Preparation of mutation mouse using ES cell, Yodo-sha (1995)).

50 Ejemplos de la célula madre embrionaria incluyen las células madre embrionarias de ratón (*Nature*, 292, 154 (1981)), rata, aves de corral, cerdo, mono, cabra o ganado vacuno.

55 Además, el animal transgénico no humano o el animal no humano genéticamente modificado también puede prepararse utilizando una técnica clonal en el que un núcleo en el que se introduce un gen deseado se trasplanta en un huevo desnucleado (*Science*, 280, 1256, (1998); *Science*, 278, 824, (1997)).

60 Una molécula inmunofuncional puede producirse introduciendo ADN que codifica la molécula inmunofuncional en un animal preparado por el procedimiento anterior para formar y acumular de este modo la molécula inmunofuncional en el animal, y a continuación recoger la molécula inmunofuncional del animal. La molécula inmunofuncional puede prepararse, por ejemplo, para que se forme y se acumule en la leche (solicitud de patente japonesa publicada no examinada nº 309192/88), o huevo del animal.

65 El procedimiento para producir una planta transgénica se describe, por ejemplo, en una referencia (*Biol. Chem.*, 380, 825 (1999)). El procedimiento para producir una planta genéticamente modificada se describe, por ejemplo,

en una referencia (*Plant Journal*, 11, 1195 (1997)).

En cuanto al procedimiento para la producción de una molécula inmunofuncional utilizando una planta, la molécula inmunofuncional puede producirse, por ejemplo, cultivando una planta transgénica en la que el introduce ADN que codifica la molécula inmunofuncional, según un procedimiento conocido (*Tissue Culture*, 20, (1994); *Tissue Culture*, 21, (1995); *Trends in Biotechnology*, 15, 45 (1997)) para formar y acumular de este modo la molécula inmunofuncional en la planta, y a continuación recoger la molécula inmunofuncional de la planta.

Además, un gen animal genéticamente modificado que puede producir una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida a N-glucósido en la que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina o una molécula inmunofuncional que tiene una cadena de azúcar unida al N-glucósido en la que fucosa está unida a N-acetilglucosamina se puede obtener por cruzamiento de un animal no humano transgénico o animal no humano genéticamente modificado de una fucosiltransferasa, preferentemente FUT8, con una estirpe homóloga pero diferente del animal transgénico de una molécula inmunofuncional deseada. El procedimiento de cruzamiento incluye, por ejemplo, el cruzamiento natural y la fertilización *in vitro*.

Además, es posible llevar a cabo la producción en masa de la cadena de azúcar introduciendo un grupo de genes que codifican las enzimas aisladas, por ejemplo, en la levadura, *E. coli* (*Nature Biotechnology*, 16, 847 (1998)). Además, la enzima producida se puede utilizar en la modificación de un anticuerpo, péptido o proteína con la cadena de azúcar o en la producción de los mismos.

Además, una cadena de azúcar que estimula la actividad de una molécula inmunofuncional, según la presente invención, puede sustituirse con un péptido (*J. Immunol.*, 160, 293 (1998)). Dicho péptido tiene utilidad en el procedimiento anterior para la utilización de cadenas de azúcar y también es excelente en vista de la conveniencia, ya que puede ser fácilmente fusionado con una molécula inmunofuncional.

Se describe a continuación un procedimiento para producir una molécula inmunofuncional que tiene una actividad inmunofuncional estimulada. Mientras que en la presente memoria se describe como ejemplo un método para producir un anticuerpo humanizado, otras moléculas inmunofuncionales pueden prepararse por el procedimiento anteriormente mencionado o según un procedimiento similar al mismo.

#### 4. Procedimiento para la producción de anticuerpo humanizado

##### *(1) Construcción del vector para la expresión del anticuerpo humanizado*

El vector para la expresión del anticuerpo humanizado es un vector de expresión para su utilización en una célula animal en la que se insertan los genes que codifican regiones C de la cadena pesada (denominada en adelante, "cadena H") y de la cadena ligera (denominada en adelante "cadena L") de un anticuerpo humano, y puede construirse mediante la clonación de cada uno de los genes que codifican las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano en un vector de expresión para células animales.

Las regiones C de un anticuerpo humano pueden ser regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano adecuado, y los ejemplos incluyen la región C de la subclase IgG1 de una cadena H de un anticuerpo humano (denominado en adelante "hC $\gamma$ 1") y la región C de una clase k de una cadena L de anticuerpo humano (denominado en adelante "hCk").

Los genes que codifican las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano pueden ser un ADN cromosómico que comprende el exón y el intrón o un ADNc.

El vector de expresión para células animales puede ser cualquier vector, siempre que pueda insertarse y expresarse un gen que codifica la región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen pAGE107 (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), pHSG274 (*Gene*, 27, 223 (1984)), pKCR (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 1527 (1981)), pSG1  $\beta$  d2-4 (*Cytotechnology*, 4, 173 (1990)). El activador y potenciador que va a utilizarse en el vector de expresión para células animales incluyen el activador precoz de SV40 y el potenciador (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), el virus LTR de la leucemia de Moloney de ratón (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 960 (1987)), el activador de la cadena H de inmunoglobulina (*Cell*, 41, 479 (1985)) y el potenciador (*Cell*, 33, 717 (1983)).

El vector para la expresión del anticuerpo humanizado puede ser cualquier vector en el que la cadena H y la cadena L del anticuerpo están presentes en vectores separados o un vector en el que están presentes en el mismo vector (denominado en adelante "vector en tándem"); sin embargo, es preferible un vector en tándem para la expresión del anticuerpo humanizado porque dichos vectores de expresión de anticuerpos humanizados en tándem se construyen fácilmente y se introducen en una célula animal y las cantidades de expresión de la cadena H y la cadena L del anticuerpo en la célula animal puede equilibrarse (*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)).

El vector construido para la expresión del anticuerpo humanizado puede utilizarse para la expresión de un

anticuerpo híbrido humano y de un anticuerpo con RDC injertada humano en células animales.

(2) Preparación del ADNc que codifica la región V del anticuerpo proveniente de animales no humanos

- 5 El ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón, se puede obtener como se describe a continuación.

10 El ADNc se sintetiza extrayendo ARNm de una célula de hibridoma capaz de producir el anticuerpo de ratón de interés. El ADNc sintetizado se clona en un vector, tal como un fago o un plásmido, para preparar una biblioteca de ADNc. Un fago recombinante o un plásmido recombinante que contiene un ADNc que codifica la región V de la cadena H y un fago recombinante o un plásmido recombinante que contiene un ADNc que codifica la región V de la cadena L se aíslan respectivamente de la biblioteca utilizando un resto de la región C o un resto de la región V de un anticuerpo conocido de ratón como sonda. Se determinan las secuencias completas de nucleótidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo de ratón de interés en el fago recombinante o en el plásmido recombinante, y las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de la cadena H y de la cadena L se deducen a partir de las secuencias de nucleótidos.

20 El animal no humano puede ser cualquier animal, tal como, por ejemplo, ratón, rata, hámster o conejo, siempre que una célula de hibridoma pueda producirse a partir de los mismos.

25 El procedimiento para la preparación de ARN completo a partir de una célula de hibridoma incluye un método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio (*Methods in Enzymol.*, 154, 3 (1987)). El procedimiento para la preparación de ARNm a partir de ARN completo incluye, por ejemplo, un método de columna oligo (dT) inmovilizada en celulosa (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab.. Press, Nueva York, 1989). También, el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (producido por Invitrogen), el kit de purificación de ARNm Quick Prep (producido por Pharmacia) pueden ponerse como ejemplos de un kit para la preparación de ARNm a partir de una célula de hibridoma.

30 Ejemplos del procedimiento para la síntesis de ADNc y la preparación de una biblioteca de ADNc incluyen procedimientos convencionales (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab.. Press, Nueva York, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, suplemento 1-34), un procedimiento que utiliza un kit disponible en el mercado, tal como Super Script™ Plasmid System para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (preparado por GIBCO BRL) o el kit ZAP-ADNc (producido por Stratagene).

35 El vector en el que el ADNc sintetizado utilizando ARNm extraído de una célula de hibridoma se inserta en la preparación de una biblioteca de ADNc puede ser cualquier vector, siempre que el ADNc se puede insertar. Los ejemplos incluyen ZAP Express (*Strategies*, 5, 58 (1992)), PBluescript II SK (+) (*Nucleic Acids Research*, 17, 9494 (1989)), λzapII (producido por Stratagene), λgt10 y λgt11 (*DNA Cloning: A Practical Approach*, 1, 49 (1985)), Lambda BlueMid (producido por Clontech), λExCell y pT7T3 18U (producido por Pharmacia), pcD2 (*Mol. Cell. Biol.*, 3, 280 (1983)) y PUC18 (*Gene*, 33, 103 (1985)).

45 Las *E. coli* que van a utilizarse para la introducción de la biblioteca de ADNc construida por un vector fago o plásmido pueden ser cualquier cepa, siempre y cuando la biblioteca de ADNc pueda introducirse, expresarse y mantenerse. Los ejemplos incluyen RL1-Blue MRF<sup>+</sup> (*Strategies*, 5, 81 (1992)), C600 (*Genetics*, 39, 440 (1954)), Y1088 e Y1090 (*Science*, 222, 778 (1983)), NM522 (*J. Mol. Biol.*, 166, 1 (1983)), K802 (*J. Mol. Biol.*, 16, 118 (1966)) y JM105 (*Gene*, 38, 275 (1985)).

50 Un método de hibridación de colonias o hibridación en placa que utiliza un isótopo o sonda marcada con fluorescencia puede utilizarse para seleccionar un clon de ADNc que codifica las regiones V de cadena H y de cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano de la biblioteca de ADNc (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab.. Press, Nueva York, 1989). Además, el ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L se pueden preparar por reacción en cadena de la polimerasa (denominada en adelante "RCP"; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab.. Press, Nueva York, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, suplemento 1-34) preparando cebadores y utilizando ADNc preparado a partir de ARNm o una biblioteca de ADNc como plantilla.

60 La secuencia de nucleótidos del ADNc seleccionada por el procedimiento anterior se puede determinar, por ejemplo, digiriendo del ADNc con enzimas de restricción apropiados, clonando los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK (-) (producido por Stratagene), llevando a cabo la reacción por un método de análisis de nucleótidos utilizado habitualmente, tal como el método dideoxi de Sanger *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)), y a continuación, analizando la secuencia utilizando un analizador automático de secuencia de nucleótidos tal como el secuenciador de ADN A.L.F. (producido por Pharmacia).

65 Si el ADNc obtenido codifica toda la secuencia de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo que contiene una secuencia señal de secreción puede confirmarse estimando la secuencia de aminoácidos completa de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de la secuencia de nucleótidos

determinada y comparándola con las secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de los anticuerpos conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, 1991).

5 (3) *Análisis de la región V de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo proveniente de animales no humanos*

En cuanto a la secuencia de aminoácidos completa de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo que comprende una secuencia señal de secreción, la longitud y la secuencia de aminoácidos del terminal N de la secuencia señal de secreción puede estimarse y los subgrupos a los que pertenecen puede conocerse comparándola con secuencias de aminoácidos completas de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, 1991). Cada secuencia de aminoácidos de RDC de las regiones V de la cadena H y de la cadena L puede identificarse también comparándola con secuencias de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, 1991).

(4) *Construcción del vector de expresión de anticuerpo híbrido humano*

Un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano puede construirse clonando ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano corriente arriba de un gen que codifica las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpo humanizado descrito en el punto 4 (1). Por ejemplo, un vector de expresión del anticuerpo híbrido humano puede producirse conectando los ADNc que codifican las regiones V de la cadena H y de la cadena L provenientes de un anticuerpo de un animal no humano, respectivamente, con un ADNc sintético que comprende unas secuencias de nucleótidos del lado del terminal 3' de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano, una secuencia de nucleótidos del lado del terminal 5' de las regiones C de la cadena H y de la cadena L provenientes de un anticuerpo humano y secuencias que reconocen a la enzima de restricción apropiada en ambos extremos terminales, y la clonación de ellos corriente arriba de un gen que codifica las regiones C de la cadena H y L de de la cadena de un anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpo humanizado descrito en el punto 4 (1) de tal manera que se expresan en una forma adecuada.

(5) *Construcción de ADNc que codifica la región V del anticuerpo con RDC injertada humano*

El ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L provenientes de un anticuerpo con RDC injertada humano se pueden obtener como se describe a continuación. En primer lugar, se selecciona la secuencia de aminoácidos del marco (denominado en adelante, "FR") de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo humano para injertar RDC de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano. Se puede utilizar cualquier secuencia como la secuencia de aminoácidos de FR de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo humano, con tal de provenga de un anticuerpo humano. Por ejemplo, pueden utilizarse las secuencias de aminoácidos de FR de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos humanos registrados en una base de datos, tal como el Protein Data Bank, una secuencia de aminoácidos común en cada subgrupo de FR de regiones V de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, 1991) y similares, pero para preparar un anticuerpo con RDC injertada humano que tiene suficiente actividad, es deseable seleccionar una secuencia de aminoácidos que tenga una gran homología (por lo menos del 60% o más) con la secuencia de aminoácidos objetivo de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano.

A continuación, la secuencia de aminoácidos objetivo de RDC de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano se injerta a la secuencia de aminoácidos seleccionada de FR de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano, y se diseñan las secuencias de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo con RDC injertada humano. Teniendo en cuenta la utilización de codones hallada en la secuencia de nucleótidos del gen del anticuerpo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, 1991), las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN y se diseñan las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo con RDC injertada humano. Basándose en las secuencias de ADN diseñadas, se sintetizan varios fragmentos de ADN sintéticos que tienen una longitud de aproximadamente 100 bases, y la RCP se lleva a cabo utilizando estos fragmentos. En este caso, basándose en la eficacia de la reacción en la RCP y la longitud del ADN que se puede sintetizar, es deseable diseñar 6 fragmentos de ADN sintético para cada cadena H y cadena L.

Además, la clonación en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado construido en el punto 4 (1) puede llevarse a cabo fácilmente introduciendo la enzima de restricción apropiada que reconoce secuencias en los terminales 5' del ADN sintético situado en ambos extremos. Después de la RCP, un plásmido con una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo

con RDC injertada humano deseado se obtiene por clonación del producto ampliado en el plásmido, tal como pBluescript SK (-) (producido por Stratagene), y determinación de la secuencia de nucleótidos mediante el método descrito en el punto 4 (2).

5 (6) *Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo con RDC injertada humano*

Se sabe que cuando sólo la RDC de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo proveniente de un animal no humano de interés se injerta simplemente a la FR de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno del anticuerpo con RDC injertada humano se reduce en comparación con la actividad del anticuerpo original proveniente de un animal no humano (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)). Como la causa de esto, se considera que no sólo las secuencias de aminoácidos de RDC, sino también varias secuencias de aminoácidos de FR de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo original provenientes de un animal no humano están directa o indirectamente relacionadas con la actividad de unión al antígeno, y estos restos de aminoácidos se transforman en diferentes restos de aminoácidos de FR de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo humano acompañados por el injerto de RDC. Para resolver este problema, en anticuerpos humanos injertados en RDC, se ha intentado identificar, entre las secuencias de aminoácidos de FR de las regiones V de la cadena H y de cadena L de un anticuerpo humano, un resto de aminoácido relacionado directamente con la unión al anticuerpo, un resto de aminoácido que interactúa con un resto de aminoácido de RDC y/o un resto de aminoácido que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y está directamente relacionado con su unión al antígeno, y aumentar la actividad de unión al antígeno reducida cambiando estos restos de aminoácidos en restos de aminoácidos hallados en el anticuerpo original provenientes de un animal no humano (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)).

En la preparación de un anticuerpo con RDC injertada humano, es preferible identificar de manera eficiente estos restos de aminoácidos de FR relacionados con la actividad de unión al antígeno, de modo que la construcción y el análisis de la estructura tridimensional de anticuerpos se lleva a cabo preferentemente utilizando un análisis cristal de rayos X (*J. Mol. Biol.*, 112, 535 (1977)) y simulación por ordenador (*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994)).

Aunque la información sobre estas estructuras tridimensionales de anticuerpos ha proporcionado información útil para la preparación de anticuerpos injertados en RDC humanos, aún no se ha establecido un procedimiento para producir un anticuerpo con RDC injertada humano aplicable a todos los anticuerpos. Es preferible por lo tanto llevar a cabo varios experimentos de prueba y error en anticuerpo individual, por ejemplo, preparando varios productos modificados de los mismos y examinando su correlación con las respectivas actividades de unión al antígeno.

La modificación de los restos de aminoácidos de la FR de las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano puede conseguirse mediante la RCP descrita en el punto 4 (5) utilizando ADN sintético para la modificación adicional. La consecución de la modificación objetivo se confirma determinando la secuencia de nucleótidos del fragmento ampliado después de la RCP, por el método descrito en el punto 4 (2).

40 (7) *Construcción del vector de expresión del anticuerpo con RDC injertada humano*

Un vector de expresión del anticuerpo con RDC injertada humano se puede construir clonando el ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo con RDC injertada humano construido en los puntos 4 (5) y 4 (6) corriente arriba del gen que codifica las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpo humanizado descrito en el punto 4 (1). Por ejemplo, entre los fragmentos de ADN sintético utilizados en la construcción de las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo con RDC injertada humano en (5) y (6) del punto 4, las secuencias que reconocen la enzima de restricción apropiada se introducen en los terminales 5' de un fragmento de ADN sintético situado en ambos extremos, y se clonaron corriente arriba del gen que codifica las regiones C de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado descrito en el punto 4 (1), de tal de manera que pueden expresarse de forma adecuada para construir de ese modo un vector de expresión del anticuerpo con RDC injertada humano.

55 (8) *Producción estable de anticuerpo humanizado*

Un transformante que puede producir un anticuerpo humanizado de manera estable se puede obtener introduciendo el vector de expresión del anticuerpo humanizado descrito en los puntos 4 (4) y 4 (7) en una célula animal apropiada.

El método para introducir un vector de expresión en una célula animal incluye, por ejemplo, un método de electroporación (solicitud de patente japonesa nº 257891/90 publicada no examinada, *Cytotechnology*, 3, 133 (1990)).

La célula animal en el que se introduce un vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser cualquier célula, con tal que sea una célula animal que puede producir el anticuerpo humanizado. Los ejemplos preferidos incluyen una célula que tiene una baja actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina para unirse

a la región Fc del anticuerpo producido y una célula que no tiene dicha actividad enzimática.

La célula que tiene una baja actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina para unirse a la región Fc del anticuerpo o no tiene dicha actividad enzimática es una célula que tiene menos enzimas o ninguna relacionadas con el enlace  $\alpha$ 1,6-. Los ejemplos incluyen una célula que tiene una baja actividad de fucosiltransferasa, preferentemente actividad de FUT8, y una célula que no tiene dicha actividad.

Ejemplos de células que tienen una baja actividad enzimática de adición de fucosa a *N*-acetilglucosamina para unirse a la región Fc del anticuerpo o no tiene ninguna actividad enzimática incluyen, por ejemplo, una célula de mieloma de rata y células YB2/0.

Una célula en la que un gen implicado en la enzima que lleva el enlace  $\alpha$ 1,6 se elimina o la actividad enzimática se reduce o elimina añadiendo una mutación al gen se puede utilizar también como una célula productora de anticuerpos.

Los ejemplos específicos incluyen las células de mieloma de ratón, tales como la célula NS0 y la célula SP2/0, las células de ovario de hámster chino, tales como la célula CHO/dhfr y la célula CHO/DG44; células de mieloma de rata, tales como la célula YB2/0 y la célula IR983F; células de mieloma humano, tal como las células Namalwa. Preferentemente, pueden utilizarse las células de ovario de hámster chino, tales como las células CHO/DG44.

Después de la introducción del vector de expresión, se puede seleccionar el transformante capaz de producir de manera estable el anticuerpo humanizado utilizando un medio para el cultivo de células animales que contiene un fármaco, tal como sulfato de G418 (denominado en adelante "G418"; producido por SIGMA) por el método descrito en la solicitud de patente japonesa nº 257891/90 publicada no examinada. El medio de cultivo de células animales incluye, por ejemplo, medio RPMI 1640 (producido por Nissui Pharmaceutical), medio GIT (producido por Nippon Pharmaceutical), medio EX-CELL 302 (producido por JRH), medio IMDM (producido por GIBCO BRL), medio de Hibridoma-SFM (producido por GIBCO BRL), o un medio preparado añadiendo diversos aditivos, tales como suero bovino fetal (denominado en adelante "SBF"), a cada uno de estos medios. El anticuerpo humanizado puede producirse cultivando del transformante obtenido en un medio, y acumularse en un sobrenadante de cultivo. La cantidad producida y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado en el sobrenadante de cultivo se pueden medir por el ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (en adelante denominado "ELISA"; *Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory*, capítulo 14, 1998; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996). Además, la producción del anticuerpo humanizado por el transformante puede aumentarse utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR por el procedimiento descrito en la solicitud de patente japonesa nº 257891/90 publicada no examinada.

El anticuerpo humanizado se puede purificar a partir de un sobrenadante de cultivo que contiene transformante utilizando una columna de proteína A (*Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory*, capítulo 8, 1988; *Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996). También, se pueden utilizar otros procedimientos de purificación utilizados generalmente para la purificación de la proteína. Por ejemplo, se puede purificar por una combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración. El peso molecular de la cadena H, de la cadena L o de la molécula completa de anticuerpo del anticuerpo humanizado purificado se puede medir mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (denominado en adelante "SDS-PAGE"; *Nature*, 227, 680 (1970)), Método de inmunotransferencia Western (*Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory*, capítulo 12, 1988; *Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996).

Un procedimiento de producción de anticuerpos se ha demostrado anteriormente utilizando una célula animal como anfitriona, y tal como se describe en el anterior punto 3, puede producirse también por una bacteria, una levadura, una célula de insecto, una célula vegetal, un animal o un vegetal.

#### (9) Evaluación de actividad de anticuerpo humanizado

La actividad del anticuerpo humanizado purificado para unirse a un antígeno o a una estirpe celular cultivada al antígeno se puede medir por el método ELISA y anticuerpos de fluorescencia (*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)). La actividad citotóxica para estirpes celulares cultivadas positivas a antígenos se puede evaluar determinando su actividad de CDC, actividad de ADCC (*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)). Además, los efectos de seguridad y terapéuticos del anticuerpo humanizado en seres humanos pueden evaluarse utilizando un modelo apropiado de una especie animal relativamente próxima a los humanos, tales como *Macaca fascicularis*.

#### 5. Procedimiento de aplicación de la molécula inmunofuncional

Como se muestra en el anticuerpo humanizado descrito en el punto 4 anterior, un anticuerpo que tiene una alta actividad de ADCC es útil en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo un cáncer, una alergia, una cardiopatía y una infección vírica o bacteriana.

- 5 En el cáncer, es decir, un tumor maligno, las células cancerosas proliferan. Los agentes contra el cáncer convencionales tienen una característica de inhibición la proliferación de las células cancerosas. Por otro lado, ya que un anticuerpo que tiene una alta actividad de ADCC puede tratar cánceres al afectar la proliferación de las células cancerosas por su efecto citotóxico, que es más eficaz como fármaco terapéutico que los agentes anticancerosos convencionales.
- 10 Puesto que la liberación de una molécula mediadora de las células inmunitarias provoca la reacción alérgica, ésta puede ser inhibida por la eliminación de las células inmunitarias utilizando un anticuerpo que tiene una alta actividad de ADCC.
- 15 La cardiovascularopatía incluye, por ejemplo, la arteriosclerosis. La arteriosclerosis se trata actualmente mediante catéter con globo, pero las cardiovascularopatías puede prevenirse y tratarse inhibiendo la proliferación de las células arteriales en la restenosis tras el tratamiento, utilizando un anticuerpo que tiene una alta actividad de ADCC.
- 20 Diversas enfermedades, incluyendo las infecciones víricas o bacterianas pueden prevenirse y tratarse inhibiendo la proliferación de las células infectadas por virus o bacterias utilizando un anticuerpo que tiene una alta actividad de ADCC.
- 25 Además, un anticuerpo que tiene inhibida la actividad de ADCC es útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. El anticuerpo que tiene inhibida la actividad de ADCC también es útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias del punto de vista de la supresión de la respuesta inmunitaria estimulada en las enfermedades autoinmunitarias.
- 30 El medicamento que contiene el anticuerpo según la presente invención puede administrarse como fármaco terapéutico solo, pero en general, es deseable proporcionarlo en forma de preparación farmacéutica producida por un método apropiado bien conocido en el campo de la técnica de la preparación farmacéutica, mezclándolo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 35 Es deseable seleccionar una vía de administración que sea la más eficaz en la realización de un tratamiento. Los ejemplos incluyen la administración oral y la administración parenteral, tales como, por ejemplo, bucal, por las vías respiratorias, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. En una preparación de anticuerpos, se prefiere la administración intravenosa.
- 40 La forma farmacéutica incluye, por ejemplo, pulverizadores, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas y tiras.
- 45 Las preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, pueden producirse utilizando, como aditivos, agua; sacáridos, tales como sacarosa, sorbitol, fructosa, etc.; glicoles, tales como polietilenglicol, propilenglicol, etc.; aceites, tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, etc.; antisépticos, tales como ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, etc.; sabores, tales como sabor a fresa, menta, etc.
- 50 Cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos se pueden producir utilizando, como aditivos, cargas, tales como lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, etc.; agentes disgregantes, tales como almidón, alginato de sodio, etc.; lubricantes, tales como estearato de magnesio, talco, etc.; aglutinantes, tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, gelatina, etc.; tensioactivos, tales como éster de ácido graso, etc.; plastificantes, tal como glicerol, etc.
- 55 Ejemplos de la preparación farmacéutica adecuada para la administración parenteral incluyen inyecciones, supositorios y atomizadores.
- 60 Las inyecciones pueden prepararse utilizando un vehículo, tal como una solución salina, una solución de glucosa o una mezcla de ambos. Alternativamente, las inyecciones en polvo pueden prepararse liofilizando el anticuerpo humanizado de la forma habitual y añadiendo al mismo cloruro de sodio.
- 65 Los supositorios pueden prepararse utilizando un vehículo tal como manteca de cacao, una grasa hidrogenada o ácido carboxílico.
- Además, los atomizadores se pueden preparar utilizando el compuesto como tal o utilizando un vehículo que no estimule la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y pueda facilitar la absorción del compuesto dispersándolo en forma de partículas finas.
- Ejemplos del vehículo incluyen lactosa y glicerol. Dependiendo de las propiedades del compuesto y el vehículo que va a utilizarse, es posible producir preparados farmacéuticos tales como atomizadores y polvos secos. Además, los componentes ejemplificados como agentes aditivos para preparados orales también se pueden añadir a estos preparados parenterales.

Aunque la dosis clínica o la frecuencia de administración varía dependiendo, por ejemplo, del efecto terapéutico objetivo, el método de administración, el período de tratamiento, la edad y el peso corporal, es por lo general de 10 µg/kg a 20 mg/kg por día y por adulto.

5 También, en relación con el método para examinar el efecto antitumoral de los anticuerpos en diversas células tumorales, los ensayos *in vitro* incluyen, por ejemplo, el método de medición de la actividad de CDC, el método de medición de la actividad de ADCC, y los ensayos *in vivo* incluyen, por ejemplo, un experimento antitumoral utilizando un sistema de tumor en un animal de experimentación tal como un ratón.

10 Se pueden llevar a cabo mediciones de actividad de CDC y de actividad de ADCC y experimentos antitumorales según los métodos descritos en las referencias (*Cancer Immunology Immunotherapy*, 36, 373 (1993); *Cancer Research*, 54, 1511 (1994)).

#### 6. Procedimiento para estimular o inhibir la actividad de moléculas inmunofuncionales

15 La actividad de una molécula inmunofuncional puede estimularse mediante la producción de un anticuerpo, péptido o proteína al que se une una cadena de azúcar exenta de fucosa por el procedimiento anterior.

20 Cuando la molécula inmunofuncional con actividad estimulada se administra al cuerpo vivo, diversas inmunocitos, incluyendo células tales como los linfocitos citolíticos, los linfocitos citolíticos naturales y los macrófagos activados como células efectoras en relación con la actividad de ADCC se activan en el cuerpo vivo, de manera que se hace posible controlar diversas respuestas inmunitarias.

25 Además, la actividad de una molécula inmunofuncional puede inhibirse produciendo un anticuerpo, un péptido o una proteína a la que una cadena de azúcar fucosa existente está unida por el procedimiento anterior.

30 Cuando la molécula inmunofuncional con actividad inhibida se administra al cuerpo vivo, las actividades de diversos inmunocitos que intervienen en la actividad de ADCC se debilitan en el cuerpo vivo, de modo que se hace posible el control de diversas respuestas inmunitarias.

Los ejemplos de la presente exposición se muestran a continuación, pero el alcance de la presente exposición no se limita a los mismos.

#### Breve explicación de los dibujos

35 La Fig. 1 es un gráfico que muestra los patrones de electroforesis de SDS-PAGE de cinco anticuerpos híbridos purificados anti-GD3 (utilizando gel de gradiente del 4 al 15%). El dibujo superior y el dibujo inferior muestran un resultado de la electroforesis en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras, respectivamente. Las bandas 1 a 7 muestran un patrón de electroforesis de marcadores de alto peso molecular, un patrón de electroforesis de anticuerpos híbridos YB2/0-GD3, un patrón de electroforesis de anticuerpos híbridos CHO/DG44-GD3, un patrón de electroforesis de anticuerpos híbridos SP2/0-GD3, un patrón de electroforesis de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (302), un patrón de electroforesis de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (GIT) y un patrón de electroforesis de marcadores de bajo peso molecular, respectivamente.

45 La Fig. 2 es un gráfico que muestra la actividad de cinco anticuerpos híbridos anti-GD3 purificados para unirse a GD3, medida por el cambio de la concentración de anticuerpos. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la actividad de unión con GD3 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. Los círculos blancos, los círculos negros, los cuadrados blancos, los cuadrados negros y los triángulos blancos muestran la actividad de anticuerpos híbridos YB2/0-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos CHO/DG44-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos SP2/0-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (302) y la actividad de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (GIT), respectivamente.

55 La Fig. 3 es un gráfico que muestra la actividad de ADCC de cinco anticuerpos híbridos anti-GD3 purificados para una estirpe celular G-361 de melanoma humano. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. Los círculos blancos, los círculos negros, los cuadrados blancos, los cuadrados negros y los triángulos blancos muestran la actividad de anticuerpo híbridos YB2/0-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos CHO/DG44-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos SP2/0-GD3, la actividad de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (302) y la actividad de anticuerpos híbridos NS0-GD3 (GIT), respectivamente.

60 La Fig. 4 es un gráfico que muestra los patrones de electroforesis de SDS-PAGE de tres anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$  purificados injertados en RDC (utilizando gel de gradiente del 4 al 15%). El dibujo superior y el dibujo inferior muestran los resultados de la electroforesis llevada a cabo en condiciones no reductoras y n condiciones reductoras, respectivamente. Las bandas 1 a 5 muestran un patrón de electroforesis de marcadores de alto peso molecular, un patrón de electroforesis de anticuerpos YB2/0-hIL-5RCDR, un patrón de electroforesis de anticuerpos CHO/d-hIL-5RCDR, un patrón de electroforesis de anticuerpos NS0-hIL-5RCDR y un patrón de

65

electroforesis de marcadores de bajo peso molecular, respectivamente.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra la actividad de tres anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$  purificados injertados en RDC para unirse a hIL-5R $\alpha$ , medida por el cambio de la concentración de los anticuerpos. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la actividad de unión con hIL-5R $\alpha$  y la concentración de los anticuerpos, respectivamente. Los círculos blancos, los círculos negros y los cuadrados blancos muestran la actividad de anticuerpo YB2/0-hIL-5R $\alpha$ RDC, la actividad del anticuerpo CHO/d-hIL-5RCDR y la actividad de NS0-hIL-5RCDR anticuerpo, respectivamente.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra la actividad de ADCC de tres purificado anti-hIL-5R $\alpha$  injertado en la RDC anticuerpos para una estirpe celular que expresa T de ratón CTLL hIL-5R-2 (H5R). El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestra la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. Los círculos blancos, círculos negros y cuadrados blancos muestran la actividad del anticuerpo YB2/0-hIL-5R $\alpha$ CDR, la actividad del anticuerpo CHO/d-hIL-5RCDR, y la actividad del anticuerpo NS0-hIL-5RCDR, respectivamente.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra la actividad de inhibición de tres anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$  purificados injertados en RDC en un modelo de *Macaca fascicularis* que aumenta los eosinófilos producidos en hIL-5. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran el número de eosinófilos en la sangre periférica y el número de días (el día del comienzo de la administración de anticuerpos y de hIL-5 se definió como día 0). Los resultados en el grupo sin administración de anticuerpos se muestran en 101 y 102, los resultados en el grupo administrado con anticuerpos YB2/0-hIL-5RCDR se muestran en 301, 302 y 303, los resultados en el grupo administrado con anticuerpos CHO/d-hIL-5RCDR se muestran en 401, 402 y 403 y los resultados en el grupo administrado con anticuerpos NS0-hIL-5RDC se muestran en 501, 502 y 503.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra un patrón de elución de la elución de HPLC en fase inversa de una cadena de azúcar tratada con PA (lado izquierdo), y un patrón de elución obtenido por tratamiento de la cadena de azúcar tratada con PA con  $\alpha$ -L-fucosidasa y a continuación analizada por HPLC en fase inversa (lado derecho), del anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$  purificado injertado en la RDC producido por YB2/0 (lado superior) y el anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$  purificado injertado en la RDC producido por NS0 (lado inferior). El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestra la intensidad de fluorescencia relativa y el tiempo de elución, respectivamente.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra un patrón de elución obtenido mediante la preparación de una cadena de azúcar tratada con PA del anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$  purificado injertado en la RDC producido por células CHO/d y analizándolo por HPLC en fase inversa. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la intensidad de fluorescencia relativa y el tiempo de elución, respectivamente.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra la actividad de unión a GD3 de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, medida al cambiar la concentración de anticuerpos. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la actividad de unión con GD3 y la concentración de anticuerpo, respectivamente. Los círculos negros y los círculos blancos muestran la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, respectivamente. El gráfico inferior muestra la actividad de ADCC de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida para una estirpe G-361 de melanoma humano. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestra la actividad citotóxica y la concentración de anticuerpo, respectivamente. Los círculos negros y los círculos blancos muestran la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, respectivamente.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra los patrones de elución obtenidos mediante el análisis de cadenas de azúcar tratadas con PA preparadas a partir de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida por una HPLC inversa. El dibujo del lado izquierdo y el dibujo del lado derecho muestran un patrón de elución de la fracción no adsorbida y un patrón de elución de una parte de la fracción adsorbida, respectivamente. El eje de ordenadas y el eje de abscisas muestran la intensidad de fluorescencia relativa y el tiempo de elución, respectivamente.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra la cantidad de producto de transcripción FUT8 por respectivas estirpes de células anfitrionas cuando se utiliza una secuencia de FUT8 de rata como referencia patrón interna. Los círculos negros y los círculos blancos muestran el resultado cuando se utilizó la estirpe celular CHO y el resultado cuando se utilizó la estirpe celular YB2/0, como célula anfitriona, respectivamente.

## Mejor modo de poner en práctica la invención

### Ejemplo 1 Producción del anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3:

#### 1. Construcción del vector de expresión en tándem, pChiLHGM4, para el anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3

Se construyó un plásmido, pChi641LGM40, ligando un fragmento de aproximadamente 4,03 kb que contiene un ADNc de la cadena L, obtenido digiriendo un vector de expresión de la cadena L, pChi641LGM4 (*J. Immunol.*

*Methods*, 167, 271 (1994)) para el anticuerpo híbrido humano anti-gangliósido GD3 (denominado en adelante "anticuerpo híbrido anti-GD3") con enzimas de restricción, *Mul* I (producida por Takara Shuzo) y *Sal* I (producida por Takara Shuzo), con un fragmento de alrededor de 3,40 kb que contiene un gen resistente a G418 y una señal de corte y empalme, obtenida por digestión de un vector de expresión pAGE107 (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)) para células animales con enzimas de restricción, *Mul* I (producida por Takara Shuzo) y *Sal* I (producida por Takara Shuzo), utilizando el kit de ligadura de ADN (producido por Takara Shuzo), y a continuación, transformación de *E. coli* HB101 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab.. Press, Nueva York, 1989) con el producto ligado utilizando el kit de ligadura de ADN (producido por Takara Shuzo).

A continuación, un fragmento de aproximadamente 5,68 kb que contiene un ADNc con cadena L, obtenido por digestión del plásmido pChi641LGM40 construido con una enzima de restricción, *Cla*I (producida por Takara Shuzo), truncándole los extremos utilizando DNA Blunting Kit (producido por Takara Shuzo) y digiriéndole más con *Mlu*I (producido por Takara Shuzo), se ligó con un fragmento de aproximadamente 8,40 kb que contiene un ADNc con cadena H, obtenido por digestión de un vector de expresión de la cadena H del anticuerpo híbrido anti-GD3, pChi641HGM4 (*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)) con una enzima de restricción, *Xho* I (producida por Takara Shuzo), truncándole los extremos utilizando DNA Blunting Kit (producido por Takara Shuzo) y digiriéndole más con *Mlu*I (producido por Takara Shuzo), utilizando Kit de Ligadura de ADN (producido por Takara Shuzo), y a continuación HB101 de *E. coli* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab..Press, Nueva York, 1989) se transformó con el producto ligado para construir de este modo un vector de expresión en tándem, pChi641LHGM4, para el anticuerpo híbrido anti-GD3.

## 2. Producción de células de forma estable que producen anticuerpo híbrido anti-GD3

Utilizando el vector de expresión en tándem, pChi641LHGM4, para el anticuerpo híbrido anti-GD3 construido en el punto 1 del ejemplo 1, se prepararon células capaces de producir de forma estable un anticuerpo híbrido anti-GD3 como se describe a continuación.

### *(1) Producción de células productoras utilizando células YB2/0 de mieloma de rata*

Después de introducir 5 µg del vector de expresión del anticuerpo anti-GD3 híbrido, pChi641LHGM4, en  $4 \times 10^6$  células de mieloma YB2/0 de rata por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), las células se pusieron en suspensión en 40 ml de RPMI1640-SBF (10) (medio RPMI1640 que contiene 10% de SBF (producido por GIBCO BRL)) y se distribuyeron en 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Veinticuatro horas después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió G418 a una concentración de 0,5 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó de los pocillos respectivos en los que se formaron colonias de transformantes que presentan resistencia a G418 y se observó crecimiento de colonias, y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante se determinó por el ensayo ELISA se muestra en el punto 3 del ejemplo 1.

En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, para aumentar la cantidad de la producción de anticuerpos utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR, cada uno de ellos se puso en suspensión en el medio RPMI1640-SBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 e inhibidor DHFR 50 nM, metotrexato (en adelante denominado "MTX"; producido por SIGMA) para proporcionar una densidad de  $1$  a  $2 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 2 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que muestran resistencia a MTX 50 nM se produjeron por cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. La actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo en los pocillos en los que se observaba crecimiento de los transformantes se determinó por el ensayo ELISA como se muestra en el punto 3 del ejemplo 1. En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observaba producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, la concentración de MTX aumentó a 100 nM y a continuación a 200 nM, y un transformante capaz de crecer en el medio RPMI1640-SBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo híbrido anti-GD3 en gran cantidad, se obtuvo finalmente por el mismo procedimiento descrito anteriormente. El transformante obtenido se hizo en una sola célula (clonación) limitando la dilución dos veces.

El clon 7.9.51 de células transformadas productoras de anticuerpos híbridos anti-GD3 obtenido se ha depositado el 5 de abril de 1999, como FERM BP-6691 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Higashi 1-1-3, Tsukuba, Ibaraki, Japón).

### *(2) Producción de células productoras utilizando células CHO/DG44*

Después de la introducción de 4 µg del vector de expresión del anticuerpo híbrido anti-GD3, pChi641LHGM4, en  $1,6 \times 10^6$  células de CHO/DG44 por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), las células se pusieron en suspensión en 10 ml de IMDM-SBF (10) (medio IMDM que contiene 10% de SBF y  $1 \times$  concentración de suplemento HT (producido por GIBCO BRL)) y se repartieron en 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Veinticuatro horas después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se

añadió G418 a una concentración de 0,5 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó del pocillo respectivo en el que se formaron colonias de transformantes que muestran resistencia a G418 y se observó crecimiento de las colonias, y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante se determinó por el ensayo ELISA se muestra en el punto 3 del ejemplo 1.

En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó la producción de anticuerpos híbridos anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, para aumentar la cantidad de producción de anticuerpos utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR, cada uno de ellos se puso en suspensión en un medio IMDM-dSBF (10) (medio IMDM que contenía 10% de suero bovino fetal dializado (denominado en adelante "dSBF"; producido por GIBCO BRL)) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 10 nM para proporcionar una densidad de  $1 \times 2 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Los transformantes que presentan resistencia a MTX 10 nM fueron producidos por el cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó su crecimiento, la concentración de MTX se incrementó a 100 nM, y un transformante capaz de crecer en medio IMDM-dSBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y 100 nM de MTX y de producir el anticuerpo híbrido anti-GD3 en gran cantidad finalmente se obtuvo por el mismo método descrito anteriormente. El transformante obtenido se preparó en una sola célula (clonación) limitando dos veces la dilución.

### (3) Producción de células productoras utilizando células NS0 de mieloma de ratón

Después de introducir 5 µg del vector de expresión del anticuerpo híbrido anti-GD3, pChi641LHGM4, en  $4 \times 10^6$  células NS0 de mieloma de ratón por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), las células se pusieron en suspensión en 40 ml de EX-CELL302-SBF (10) (medio EX-CELL302 que contenía SBF al 10% y L-glutamina 2 mM (en adelante, "L-Gln"; producida por GIBCO BRL)) y se repartió en 200 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Veinticuatro horas después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió G418 a una concentración de 0,5 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó de los pocillos respectivos en los que se formaron colonias de, los transformantes que presentan resistencia a G418 y se observó el crecimiento de colonias, y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-GD3 en el sobrenadante se determinó por el ensayo ELISA como se muestra en el punto 3 del ejemplo 1.

En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó la producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, para aumentar la cantidad de la producción de anticuerpos utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR, cada uno de ellos se puso en suspensión en un medio EX-CELL302-dSBF (10) (medio EX-CELL302 que contiene dSBF al 10% y L-Gln 2 mM) que contiene 0,5 mg/ml de G418 y MTX 50 nM para proporcionar una densidad de  $1 \times 2 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 2 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que presentan resistencia a MTX 50 nM fueron producidos por el cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. La actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo en los pocillos en los que se observó crecimiento de los transformantes se determinó por el ensayo ELISA mostrado en el punto 3 del ejemplo 1. En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó la producción del anticuerpo híbrido anti-GD3 en sobrenadantes de cultivo, la concentración de MTX se aumentó a 100 nM y a continuación a 200 nM, y un transformante capaz de crecer en el medio EX-CELL302-dSBF (10) que contiene 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo híbrido anti-GD3 en gran cantidad se obtuvo finalmente por el mismo procedimiento descrito anteriormente. El transformante obtenido se preparó en una sola célula (clonación) limitando dos veces la dilución.

### 3. Medición de la actividad de unión del anticuerpo a GD3 (ELISA)

La actividad de unión del anticuerpo a GD3 se determinó como se describe a continuación.

En 2 ml de solución de etanol que contenía 10 µg de dipalmitoilfosfatidilcolina (producido por SIGMA) y 5 µg de colesterol (producido por SIGMA), se disolvieron 4 nmoles de GD3. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos para ELISA (fabricada por Greiner), se repartieron 20 µl de la solución (40 pmol/pocillo en la concentración final), seguido de secado al aire, PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino (denominado en adelante "ASB", producida por SIGMA) (denominado en adelante "PBS-1% BSA") se repartió en 100 µl/pocillo, y después la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos restantes. Después de descartar PBS-1% BSA, un sobrenadante de cultivo de un transformante o una solución diluida de un anticuerpo híbrido humano se repartió en 50 µl/pocillo para llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, cada pocillo se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (producido por Wako Pure Chemical Industries) (en adelante denominado "Tween-PBS"), una solución de anticuerpos (H & L) anti-IgG humana en cabra marcada con peroxidasa (producido por American Qualex) diluida 3000 veces con PBS-1% BSA se repartió en 50 µl/pocillo como una solución de anticuerpo secundario, y a continuación la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y el lavado posterior con Tween-PBS, la solución de sustrato ABTS (solución preparada por disolución de 0,55 g de sal amónica de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en 1 litro de tampón citrato 0,1 M (pH 4,2) y adición de 1 µl/ml de peróxido de

hidrógeno a la solución justo antes de su uso) se repartió en 50 µl/pocillo para desarrollo de color, y a continuación se midió la absorbancia a 415 nm (denominado en adelante "OD415").

#### 4. Purificación del anticuerpo híbrido anti-GD3

##### (1) Cultivo de células productoras proveniente de células YB2/0 y purificación de anticuerpos

El clon de célula transformada productor de anticuerpos anti-GD3 híbridos obtenido en el punto 2(1) anterior del ejemplo 1 se puso en suspensión en el medio Hibridoma-SFM que contenía BSA al 0,2%, MTX 200 nM y triyodotironina 100 nM (denominada en adelante "T3", producida por SIGMA) para proporcionar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y se cultivaron utilizando un frasco centrifugador de 2,0 litros de capacidad (fabricado por Iwaki Glass) en agitación a una velocidad de 50 rpm. Diez días después del cultivo a 37°C en una sala de control de la temperatura, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo híbrido anti-GD3 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido YB2/0-GD3.

##### (2) Cultivo de células productoras provenientes de células CHO/DG44 y purificación de anticuerpos

El clon de célula transformada productor de anticuerpos anti-GD3 híbridos obtenido en el punto 2(2) anterior del ejemplo 1 se puso en suspensión en el medio EX-CELL302 que contenía L-Gln 3 mM, solución concentrada de ácido graso al 0,5% (denominada en adelante "CDLC"; producida por GIBCO BRL) y Pluronic F68 al 0,3% (denominado en adelante "PF68"; producido por GIBCO BRL) para proporcionar una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml, y la suspensión se repartió en 50 ml en matraces de 175 mm<sup>2</sup> (fabricados por Greiner). Cuatro días después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo híbrido anti-GD3 se purificó en el sobrenadante del cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido CHO/DG44-GD3.

##### (3) Cultivo de células productoras provenientes de células NS0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos anti-GD3 híbridos obtenido en el punto 2(3) anterior del ejemplo 1 se puso en suspensión en el medio EX-CELL302 que contenía L-Gln 2 mM, 0,5 mg/ml de G418, MTX 200 nM y SBF al 1 %, para proporcionar una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml, y la suspensión se repartió en 200 ml en matraces de 175 mm<sup>2</sup> (fabricados por Greiner). Cuatro días de cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo anti-GD3 híbrido se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-GD3 híbrido purificado se denominó anticuerpo NS0-GD3 híbrido (302). Además, el clon de células transformadas se puso en suspensión en el medio GIT que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM para proporcionar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 200 ml en matraces de 175 mm<sup>2</sup> (fabricados por Greiner). Diez días después de cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo anti-GD3 híbrido se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-GD3 híbrido purificado se denominó anticuerpo NS0-GD3 híbrido (GIT).

##### (4) Cultivo de células productoras proveniente de células SP2/0 y purificación de anticuerpos

El clon de células transformadas productoras de anticuerpos anti-GD3 híbridos descrito en la solicitud de patente japonesa publicada no examinada n° 304989/93 se puso en suspensión en el medio GIT que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM para proporcionar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 200 ml en matraces de 175 mm<sup>2</sup> (fabricados por Greiner). Ocho días después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo anti-GD3 híbrido se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Bioprocessing) según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo híbrido anti-GD3 purificado se denominó anticuerpo híbrido SP2/0-GD3.

#### 5. Análisis de los anticuerpos anti-GD3 híbridos purificados

De acuerdo con un método conocido (*Nature*, 227, 680, 1970), 4 µg de cada uno de los cinco anticuerpos híbridos anti-GD3 producidos por células animales y purificados en las mismas, obtenidos en el punto 4 del ejemplo 1 anterior, se sometieron a SDS-PAGE para analizar el peso molecular y el grado de purificación. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Como se muestra en la Fig. 1, una única banda de aproximadamente 150 kilodaltons (denominada en adelante "Kd") de peso molecular se encontró en condiciones no reductoras, y dos bandas de aproximadamente 50 Kd y aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras, en cada uno de los anticuerpos anti-GD3 híbridos purificados. Estos pesos moleculares coincidieron casi con los pesos moleculares deducidos de las secuencias nucleotídicas de ADNc de la cadena H y la cadena L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 Kd, cadena L: aproximadamente 23 Kd, molécula completa: aproximadamente 144 Kd), y coincidieron también con los informes que indican que el anticuerpo IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 150 Kd en

condiciones no reductoras y se degrada en las cadenas H que tienen un peso molecular de aproximadamente 50 Kd y en cadenas L que tienen un peso molecular de aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras debido al corte del enlace disulfuro (en adelante, "enlace S-S") en la molécula (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, 1998; *Antibodies Monoclonal: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996), de modo que se confirmó que cada anticuerpo anti-GD3 híbrido se expresó y se purificó como una molécula de anticuerpo que tiene la verdadera estructura.

## Ejemplo 2 Evaluación de la actividad del anticuerpo anti-GD3 híbrido:

### 1. Actividad de unión de los anticuerpos anti-GD3 híbridos a GD3 (ELISA)

La actividad de los cinco anticuerpos anti-GD3 híbridos purificados obtenidos en el punto 4 anterior del ejemplo 1 para unirse a GD3 (producido por Snow Brand Milk Products) se determinó por el ensayo ELISA mostrado en el punto 3 del ejemplo 1. La Fig. 2 muestra un resultado del examen de la actividad de unión medida cambiando la concentración del anticuerpo híbrido anti-GD3 que debe añadirse. Como se muestra en la Fig. 2, los cinco anticuerpos anti-GD3 híbridos mostraron casi la misma actividad de unión a GD3. Este resultado demuestra que las actividades de unión al antígeno de estos anticuerpos son constantes independientemente de las células de origen animal productoras de anticuerpos y sus métodos de cultivo. Además, se sugirió a partir de la comparación del anticuerpo NS0-GD3 híbrido (302) con el anticuerpo NS0-GD3 híbrido (GIT) que las actividades de unión al antígeno son constantes independientemente de los medios utilizados en el cultivo.

### 2. Actividad citotóxica *in vitro* (actividad de ADCC) del anticuerpo anti-GD3 híbrido

Con objeto de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los cinco anticuerpos anti-GD3 híbridos purificados obtenidos en el punto 4 anterior del ejemplo 1, se determinó la actividad de ADCC según el siguiente procedimiento.

#### (1) Preparación de la solución de células diana

Se cultivó una estirpe celular G-361 cultivada de melanoma humano (ATCC CRL 1424) utilizando el medio RPMI1640-SBF (10) para preparar  $1 \times 10^6$  células, y las células se marcaron con radioisótopos haciéndolas reaccionar con 3,7 MBq equivalentes de una sustancia radiactiva  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  a 37°C durante 1 hora. Después de la reacción, las células se lavaron tres veces con su suspensión en el medio RPMI1640-SBF (10) y centrifugación, se volvieron a poner en suspensión en el medio y a continuación se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos en hielo para la disolución espontánea de la sustancia radiactiva. Después de la centrifugación, el precipitado se ajustó a  $2 \times 10^5$  células/ml mediante la adición de 5 ml de la RPMI1640-SBF (10) y se utilizó como solución de células diana.

#### (2) Preparación de la solución de células efectoras

Se recogieron 50 ml de sangre venosa de una persona sana, y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sódica (producida por Takeda Pharmaceutical). La mezcla se centrifugó para aislar una capa de células mononucleares utilizando Lymphoprep (producido por Nycomed Pharma AS) según las instrucciones del fabricante. Después de lavar con el medio RPMI1640-SBF (10) de centrifugación tres veces, el precipitado resultante se volvió a poner en suspensión para proporcionar una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml utilizando el medio y se utilizó como solución de células efectoras.

#### (3) Medición de la actividad de ADCC

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en forma de U (fabricada por Falcon), se repartieron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de células diana preparada en el punto (1) anterior ( $1 \times 10^4$  células/pocillo). A continuación se añadieron a la misma 100  $\mu\text{l}$  de la solución de células efectoras preparada en el punto (2) anterior ( $2 \times 10^5$  células/pocillo, la proporción de células efectoras a células diana llega a ser 20:01). Posteriormente, se añadió cada uno de los anticuerpos anti-GD3 híbridos para proporcionar una concentración final de 0,0025 a 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de reacción a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, la placa se centrifugó, y se midió la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante utilizando un contador  $\gamma$ . La cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  liberado espontáneamente se calculó mediante la misma operación utilizando sólo el medio en lugar de la solución de células efectoras y la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante. La cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  liberado total se calculó mediante la misma operación utilizando sólo el medio en lugar de la solución de anticuerpos y añadiendo ácido clorhídrico 1 N en lugar de la solución de células efectoras, y midiendo la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante. La actividad de ADCC se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad de ADCC\%} = \frac{{}^{51}\text{Cr en la muestra sobrenadante} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}}{{}^{51}\text{Cr liberado total} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Fig. 3. Como se muestra en la Fig. 3, entre los cinco anticuerpos anti-GD3 híbridos, el anticuerpo YB2/0-GD3 híbrido mostró la mayor actividad de ADCC, seguido por el anticuerpo SP2/0-GD3 híbrido, el anticuerpo NS0-GD3 híbrido y el anticuerpo híbrido CHO-GD3 en ese orden. No se encontró diferencia en la actividad de ADCC entre el anticuerpo NS0-GD3 híbrido (302) y el anticuerpo NS0-GD3 híbrido (GIT) preparado utilizando diferentes medios en el cultivo. Los resultados anteriores demuestran que la actividad de ADCC de anticuerpos varía en gran medida dependiendo de las células animales que van a utilizarse en su producción. Como su mecanismo, ya que sus actividades de unión al antígeno eran idénticas, se considera que estaba producida por una diferencia en la estructura de la región Fc de anticuerpo.

### Ejemplo 3 Producción de anticuerpo con RDC injertada humano de la cadena $\alpha$ del receptor de interleucina 5 anti-humano:

#### 1. Producción de células que producen de forma estable anticuerpo con RDC injertada humano de la cadena $\alpha$ del receptor de interleucina 5 anti-humano

##### *(1) Producción de la célula productora utilizando células YB2/0 de mieloma de rata*

Utilizando el vector de expresión del anticuerpo con RDC injertada humano de la cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 5 anti-humano (en adelante denominado "anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$ "), pKANTEX1259HV3LVO, descrito en el documento WO 97/10354, células capaces de producir de forma estable anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC  $\alpha$  se prepararon como se describe a continuación.

Después de la introducción de 5  $\mu$ g del vector de expresión del anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$ , pKANTEX1259HV3LVO, en  $4 \times 10^6$  células de mieloma de rata YB2/0 por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), las células se pusieron en suspensión en 40 ml de RPMI 1640-SBF (10) y se repartieron en 200  $\mu$ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Veinticuatro horas después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió G418 para proporcionar una concentración de 0,5 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó de los pocillos respectivos en los que se formaron colonias de transformantes que muestran resistencia a G418 y se observó crecimiento de colonias, y la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  en el sobrenadante se determinó por el ensayo ELISA según se muestra en el punto 2 del ejemplo 3.

En cuanto a los transformantes en pocillos en los que se observó producción de los anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo, con objeto de aumentar la cantidad de la producción de anticuerpos utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR, cada uno de los ellos se puso en suspensión en el medio RPMI1640-SBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 50 nM para proporcionar una densidad de 1 a  $2 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 2 ml en pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que presentan resistencia a MTX 50 nM se produjeron cultivando a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. La actividad de unión al antígeno de los anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo en los pocillos en los que se observó crecimiento de transformantes se determinó por el ensayo ELISA mostrado en el punto 2 del ejemplo 3. En cuanto a los transformantes en pocillos en los que se observó producción del anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo, la concentración de MTX aumentó a 100 nm y a continuación a 200 nM, y un transformante capaz de crecer en el medio RPMI1640-SBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y de producir el anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$  en una gran cantidad se obtuvo finalmente de la misma manera que se describió anteriormente. El transformante obtenido se preparó en una sola célula (clonación) limitando dos veces la dilución. El clon n° 3 de célula transformada productor de anticuerpos anti-hIL-5R injertado a RDC  $\alpha$  se ha depositado el 5 de abril de 1999, como FERM BP-6690 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (Higashi 1-1-3, Tsukuba, Ibaraki, Japón).

##### *(2) Producción de células productoras utilizando células CHO/dhfr*

Después de introducir 4  $\mu$ g del vector de expresión del anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$ , pKANTEX1259HV3LVO, describe en el documento WO 97/10354 en  $1,6 \times 10^6$  células de CHO/dhfr por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), las células se pusieron en suspensión en 10 ml de IMDM-SBF (10) y se repartieron en 200  $\mu$ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Veinticuatro horas después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió G418 para proporcionar una concentración de 0,5 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. El sobrenadante de cultivo se recuperó de los pocillos respectivos en los que se formaron colonias de transformantes que presentan resistencia a G418 y se

observó crecimiento de colonias, y la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  en el sobrenadante se determinó por el ensayo ELISA según se muestra en el punto 2 del ejemplo 3.

En cuanto a los transformantes en los pocillos en los que se observó producción de anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo, con objeto de aumentar la cantidad de producción de anticuerpos utilizando un sistema de ampliación del gen DHFR, cada uno de los transformantes se puso en suspensión en un medio IMDM-dSBF(10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y MTX 10 nM para proporcionar una densidad de  $1 \text{ a } 2 \times 10^5$  células/ml, y la suspensión se repartió en 0,5 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Iwaki Glass). Los transformantes que presentan resistencia a MTX 10 nM fueron producidos por el cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. En cuanto a los transformantes en los pocillos en los cuales se observó su crecimiento, la concentración de MTX aumentó a 100 nM y después a 500 nM, y un transformante capaz de crecer en medio IMDM-dSBF (10) que contenía 0,5 mg/ml de G418 y 500 nM de MTX y de producir anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$  en gran cantidad se obtuvo finalmente de la misma manera que la descrita anteriormente. El transformante obtenido se produjo en una sola célula (clonación) limitando la dilución dos veces.

(3) Producción de célula productora utilizando células de mieloma de ratón NS0

Un vector de expresión del anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$  se preparó según el método de Yarranton *et al.* (*BIO/TECHNOLOGY*, 10, 169 (1992)) y utilizando ADNc de la cadena H y la cadena L del anticuerpo en el vector de expresión del anticuerpo anti-hIL-5R injertado en la RDC  $\alpha$ , pKANTEX1259HV3LV0, descrito en el documento WO 97/10354, y células NS0 se transformaron para obtener un transformante capaz de producir el anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC en una gran cantidad. El transformante obtenido se hizo en una sola célula (clonación) limitando la dilución dos veces.

## 2. Medición de la actividad de unión del anticuerpo a hIL-5R $\alpha$ (ELISA)

Se determinó la actividad de unión del anticuerpo a hIL-5R  $\alpha$  como se describe a continuación.

Se preparó una solución diluyendo el anticuerpo anti-hIL-5R, KM1257  $\alpha$  de ratón, se describe en el documento WO 97/10354 con PBS para proporcionar una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , y 50  $\mu\text{l}$  de la solución resultante se repartió en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para ELISA (producido por Greiner), seguido de reacción a 4°C durante 20 horas. Después de la reacción, 1% de BSA-PBS se repartió en 100  $\mu\text{l/pocillo}$ , y después la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos restantes. Después de descartar PBS-1% BSA, una solución preparada por dilución del hIL-5R  $\alpha$  soluble descrito en el documento WO 97/10354 con 1% de BSA-PBS para proporcionar una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  se repartió en 50  $\mu\text{l/pocillo}$ , seguido de reacción a 4°C durante 20 horas. Después de la reacción, cada pocillo se lavó con Tween-PBS, los sobrenadantes de cultivo de transformantes o las soluciones diluidas de unos anticuerpos humanos purificados injertados en RDC se repartieron en 50  $\mu\text{l/pocillo}$  para llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, cada pocillo se lavó con Tween-PBS, una solución de anticuerpos IgG anti-humano de cabra marcado con peroxidasa (H & L) (producida por American Qualex) diluida 3000 veces con 1% de BSA-PBS se repartió en 50  $\mu\text{l/así}$  como una solución de anticuerpo secundario, seguida de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y lavado posterior con Tween-PBS, la solución de sustrato ABTS (una solución preparada disolviendo 0,55 g de sal amónica de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en 1 litro de tampón citrato 0,1 M (pH 4,2) y la adición de 1  $\mu\text{l/ml}$  de peróxido de hidrógeno a la solución justo antes de su uso) se repartieron en 50  $\mu\text{l/pocillo}$  para desarrollo de color, y a continuación se midió la absorbancia a OD415.

## 3. Purificación de anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$ injertados en la RDC

### (1) Cultivo de células productoras provenientes de células YB2/0 y purificación de anticuerpos

El clon de célula transformada productor de anticuerpos injertados en la RDC anti-hIL-5R  $\alpha$  obtenido en el punto 1(1) anterior del ejemplo 3 se puso en suspensión en el medio GIT que contenía 0,5 mg/ml de G418 y 200 nM de MTX para proporcionar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y se repartió en 200 ml en matraces de 175 mm<sup>2</sup> (fabricados por Greiner). El sobrenadante del cultivo se recuperó ocho días después del cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de intercambio iónico y un método de filtración en gel. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  purificado injertado en la RDC se denominó anticuerpo YB2/0-hIL-5RCDR.

### (2) Cultivo de células productoras provenientes de célula sCHO/dhfr y purificación de anticuerpos

El clon de célula transformada productor de anticuerpos injertados en la RDC anti-hIL-5R  $\alpha$  obtenido en el punto 1 (2) anterior del ejemplo 3 se puso en suspensión en el medio EX-CELL302 que contenía L-Gln 3 mM, CDLC al 0,3% y PF68 al 0,5% para proporcionar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y se cultivaron utilizando un frasco centrifugador de 4,0 litros de capacidad (producido por Iwaki Glass) en agitación a una velocidad de 100 rpm. Diez días después del cultivo a 37°C en una sala con control de la temperatura, se recuperó el sobrenadante del cultivo. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando

cromatografía de intercambio iónico y un método de filtración en gel. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  purificado injertado en la RDC se denominó anticuerpo CHO/d-hIL-5RCDR.

### (3) Cultivo de células productoras provenientes de células NS0 y purificación de anticuerpos

El clon de célula transformada productor de anticuerpos injertados en la RDC anti-hIL-5R  $\alpha$  obtenido en el punto 1(3) anterior del ejemplo 3 se cultivó según el método de Yarranton *et al.* (*BIO/TECHNOLOGY*, 10, 169 (1992)) y a continuación, se recuperó un sobrenadante de cultivo. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de intercambio iónico y el método de filtración en gel. El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  purificado injertado en la RDC se denominó anticuerpo NS0-LIS-5RCDR.

### 4. Análisis de anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$ injertados en RDC purificado

Según un método conocido (*Nature*, 227, 680, (1970)), 4  $\mu$ g de cada uno de los tres anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  injertados en RDC producidos por las respectivas células animales y purificados en las mismas, obtenidos en el punto 3 anterior del ejemplo 3, se sometió a SDS-PAGE para analizar el peso molecular y el grado de purificación. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Como se muestra en la Fig.4, se observó una única banda de aproximadamente 150 Kd de peso molecular en condiciones no reductoras, y dos bandas de aproximadamente 50 Kd y aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras, en cada uno de los anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  purificados injertados en RDC. Estos pesos moleculares coincidieron casi con los pesos moleculares deducidos de las secuencias de nucleótidos de ADNc de la cadena H y la cadena L del anticuerpo (cadena H: aproximadamente 49 Kd, cadena L: aproximadamente 23 Kd, molécula completa: aproximadamente 144 Kd), y coincidían también con los informes que indican que el anticuerpo IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 150 Kd en condiciones no reductoras y se degrada en cadenas H que tienen un peso molecular de aproximadamente 50 Kd y cadenas L que tienen un peso molecular de aproximadamente 25 Kd en condiciones reductoras debido al corte del enlace disulfuro (denominado en adelante, "enlace SS") en la molécula (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, 1998; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited, 1996), de modo que se confirmó que cada anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC se expresó y se purificó como una molécula de anticuerpo que tiene la verdadera estructura.

### Ejemplo 4 Evaluación de la actividad del anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$ injertado en la RDC:

#### 1. Actividad de unión de anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$ injertados en la RDC a hIL-5R $\alpha$ (ELISA)

La actividad de los tres anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  purificados injertados en RDC obtenidos en el punto 2 anterior del ejemplo 3 para unirse a la hIL-5R  $\alpha$  se determinó por el ensayo ELISA mostrado en el punto 2 del ejemplo 3. La Fig. 5 muestra un resultado del examen de la actividad de unión medida cambiando la concentración de los anticuerpos anti-hIL-5R injertados en la RDC  $\alpha$  que van a añadirse. Como se muestra en la Fig. 5, los tres anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  injertados en la RDC presentaron casi la misma actividad de unión a  $\alpha$  hIL-5R. Este resultado demuestra que las actividades de unión al antígeno de estos anticuerpos son constantes independientemente de las células productoras de anticuerpos de origen animal y sus métodos de cultivo, similar al resultado del punto 1 del ejemplo 2.

#### 2. Actividad citotóxica *in vitro* (actividad de ADCC) de anticuerpos anti-hIL-5R $\alpha$ injertados en la RDC

Con objeto de evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los tres anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  purificados injertados en RDC obtenidos en el punto 3 anterior del ejemplo 3, se determinó la actividad de ADCC según el siguiente método.

##### (1) Preparación de la solución de células diana

Una estirpe de linfocitos T de ratón CTLL-2 (h5R) que expresan la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  de hIL-5R descrita en el documento WO 97/10354 se cultivó utilizando el medio RPMI1640-SBF (10) para preparar una suspensión de  $1 \times 10^6$  cells/0,5 ml, y las células se marcaron con radioisótopos haciéndolas reaccionar con 3,7 MBq equivalentes de una sustancia radioactiva  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  a 37°C durante 1,5 horas. Después de la reacción, las células se lavaron tres veces a través de su suspensión en el medio RPMI1640-SBF (10) y centrifugación, se volvieron a poner en suspensión en el medio y a continuación se dejaron reposar a 4°C durante 30 minutos en hielo para la disolución espontánea de la sustancia radiactiva. Después de la centrifugación, el precipitado se ajustó a  $2 \times 10^5$  células/ml añadiendo 5 ml del medio RPMI1640-SBF (10) y se utiliza como solución de células diana.

##### (2) Preparación de la solución de células efectoras

Se recogieron 50 ml de sangre venosa de una persona sana y se mezclaron suavemente con 0,5 ml de heparina sódica (producido por Takeda Pharmaceutical). La mezcla se centrifugó para separar una capa de células mononucleares utilizando Polymorphprep (producido por Nycomed Pharma AS) y según las instrucciones del fabricante. Después de lavar con medio RPMI1640-SBF (10) por centrifugación tres veces, las células resultantes se volvieron a poner en suspensión para proporcionar una densidad de  $9 \times 10^6$  células/ml utilizando el medio y se utilizaron como la solución de células efectoras.

### (3) Medición de la actividad de ADCC

En cada pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos (fabricada por Falcon), se repartieron 50 µl de la solución de células diana preparada en el punto (1) anterior ( $1 \times 10^4$  células/pocillo). A continuación, se repartieron 100 µl de la solución de células efectoras preparadas en el punto (2) anterior ( $9 \times 10^5$  células/pocillo, la relación de células efectoras a células diana se convierte en 90:1). Posteriormente, se añadió cada uno de los anticuerpos anti-hIL-5R α injertados en RDC para proporcionar una concentración final de 0,001 a 0,1 µg/ml, seguido de reacción a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, la placa se centrifugó, y se determinó la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante. La cantidad de liberado espontáneamente  $^{51}\text{Cr}$  se calculó mediante la misma operación utilizando sólo el medio en lugar de la solución de células efectoras y la solución de anticuerpo y determinando la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante. La cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  liberado total se calculó mediante la misma operación utilizando sólo el medio en lugar de la solución de anticuerpos y la adición de ácido clorhídrico 1 N, en lugar de la solución de células efectoras, y determinando la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante.

La actividad de ADCC se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad de ADCC\%} = \frac{{}^{51}\text{Cr en la muestra sobrenadante} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}}{{}^{51}\text{Cr liberado total} - {}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Como se muestra en la Fig. 6, entre los tres anticuerpos anti-hIL-5R α injertados en RDC, el anticuerpo YB2/0-hIL-5RCDR mostró la mayor actividad de ADCC, seguido del anticuerpo CHO/d-hIL-5RCDR y del NS0-hIL-5RCDR en este orden. Al igual que el resultado del punto 2 del ejemplo 2, los resultados anteriores demuestran que la actividad de ADCC de los anticuerpos varía en gran medida dependiendo de las células animales que deben utilizarse en su producción. Además, dado que los anticuerpos producidos por la célula YB2/0 mostraron la actividad de ADCC más alta en ambos casos de los dos anticuerpos humanizados, se reveló que un anticuerpo que tiene alta actividad de ADCC puede producirse mediante la utilización de la célula YB2/0.

### 3. Evaluación de la actividad *in vivo* de anticuerpos anti-hIL-5R α injertados en la RDC

Con objeto de evaluar la actividad *in vivo* de los tres anticuerpos anti-hIL-5R α purificados injertados en RDC obtenidos en el punto 3 anterior del ejemplo 3, se examinó la actividad de inhibición en un modelo de *Macaca fascicularis* que aumenta la eosinofilia producida por hIL-5 según el siguiente procedimiento.

La hIL-5 (procedimiento de preparación se describe en el documento WO 97/10354) se administró a *Macaca fascicularis* bajo la piel dorsal a una dosis de 1 µg/kg, comenzando el primer día y una vez al día para un total de 14 veces. Cada anticuerpo anti-hIL-5R α injertado en la RDC se administró por vía intravenosa a una dosis de 0,3 mg/kg una hora antes de la administración de hIL-5 el día cero. Un grupo sin anticuerpos añadidos se utilizó como referencia. En los grupos administrados con anticuerpos, se utilizaron tres animales de *Macaca fascicularis* en cada grupo (nº 301, nº 302, nº 303, nº 401, nº 402, nº 403, nº 501, nº 502 y nº 503), y dos animales (nº 101 y nº 102) se utilizaron en el grupo sin anticuerpos. Desde 7 días antes del comienzo de la administración y hasta 42 días después de la administración, se recogió periódicamente alrededor de 1 ml de sangre de la vena safena o de la vena femoral, y se determinó el número de eosinófilos en 1 µl de sangre periférica. Los resultados se muestran en la Fig. 7. Como se muestra en la Fig. 7, el aumento de eosinófilos en la sangre se inhibió completamente en el grupo al que se administró el anticuerpo YB2/0-hIL-5RCDR. Por otro lado, se encontró actividad de inhibición completa en un animal en el grupo al que se administró el anticuerpo CHO/d-hIL-5RCDR, pero no se encontró actividad de inhibición completa y su efecto no fue suficiente. En el grupo al que se administró anticuerpo NSO-hIL-5RCDR, actividad de inhibición completa no se ha encontrado y su efecto no fue suficiente. Los resultados anteriores demuestran que la actividad *in vivo* de los anticuerpos varía en gran medida dependiendo de las células animales que han de utilizarse en su producción. Además, dado que se encontró una correlación positiva entre el grado de la actividad *in vivo* del anticuerpo anti-hIL-5R α injertado en la RDC y el grado de su actividad de ADCC descrito en el punto 2 del ejemplo 4, se indicó que el grado de actividad de ADCC es muy importante para su expresión de actividad.

Basándose en los resultados anteriores, es de esperar que un anticuerpo que tiene una gran actividad de ADCC es útil también en el campo clínico para diversas enfermedades en seres humanos.

### **Ejemplo 5 Análisis de la cadena de azúcar que aumenta la actividad de ADCC:**

#### 1. Preparación de la cadena de azúcar marcada con 2-aminopiridina (cadena de azúcar tratada con partícula)

El anticuerpo humanizado de la presente invención se hidrolizó con ácido clorhídrico para eliminar el ácido siálico. Una vez eliminado completamente ácido clorhídrico, la cadena de azúcar se cortó de la proteína por hidrazinolisis (*Method of Enzymology*, 83, 263, 1982). Se eliminó la hidracina, y se llevó a cabo la N-acetilación

mediante la adición de una solución acuosa de acetato de amonio y anhídrido acético. Después de la liofilización, se llevó a cabo el marcado de fluorescencia con 2-aminopiridina (*J. Biochem.*, 95, 197 (1984)). La cadena de azúcar marcada con fluorescencia (cadena de azúcar tratada con PA) se separó como impureza utilizando la columna Surperdex Peptide HR 10/30 (fabricada por Pharmacia). La fracción de cadena de azúcar se secó utilizando un concentrador centrífugo y se utilizó como cadena de azúcar tratada con PA purificada.

## 2. Análisis por HPLC en fase inversa de la cadena de azúcar tratada con PA de anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$ purificado injertado en la RDC

Utilizando las respectivas cadenas de azúcar tratadas con PA de anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC preparadas en el punto 1 anterior del ejemplo 5, se llevó a cabo el análisis de HPLC en fase inversa por la columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu). Una cantidad en exceso de  $\alpha$ -L-fucosidasa (proveniente de riñón bovino, producido por SIGMA) se añadió a la cadena de azúcar tratada con PA para la digestión (37°C, 15 horas), y a continuación los productos se analizaron por HPLC en fase inversa (Fig. 8). Utilizando patrones de la cadena de azúcar tratados con PA preparados por Takara Shuzo se confirmó que la cadena de azúcar unida a asparagina se eluye durante un periodo entre 30 y 80 minutos. Se calculó la relación de cadenas de azúcar cuyas posiciones de elución de HPLC en fase inversa se desplazaron (cadenas de azúcar eluidas durante un período de 48 minutos a 78 minutos) por digestión con  $\alpha$ -L-fucosidasa. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Células productoras de anticuerpos	Cadena de azúcar unida a $\alpha$ -1,6-fucosa (%)
YB2/0	47
NS0	73

Aproximadamente 47% de los anticuerpos injertados con anti-hIL-5RCDR producidos por la célula YB2/0 y aproximadamente el 73% de los anticuerpos injertados con anti-hIL-5RCDR producidos por la célula NS0 eran cadenas de azúcar que tienen  $\alpha$ -1,6-fucosa. Por lo tanto, las cadenas de azúcar que no tienen  $\alpha$ -1,6-fucosa fueron más frecuentes en el anticuerpo producido por la célula YB2/0 que el anticuerpo producido por la célula NS0.

## 3. Análisis de la composición de monosacáridos de anticuerpo anti-hIL-5R $\alpha$ purificado injertado en la RDC

Las cadenas de azúcar de anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  injertados en la RDC producidos por las células YB2/0, células NS0 y células CHO/d se hidrolizaron en monosacáridos por hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético, y el análisis de composición de monosacáridos se llevó a cabo utilizando BioLC (producido por Dionex).

Entre las cadenas de azúcar unidas a *N*-glucósido, hay 3 unidades de manosa en una cadena de azúcar en la cadena de azúcar unida a *N*-glucósido de tipo complejo. Una proporción relativa de cada monosacárido obtenida calculando la suma de manosas como 3 se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Célula productora de anticuerpos	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	Actividad de ADCC (%) *
YB2/0	0,60	4,98	0,30	3,00	42,27
NS0	1,06	3,94	0,66	3,00	16,22
CHO/DHFr	0,85 0,91	3,59 3,80	0,49 0,27	3,00 3,00	25,73

\*: Concentración de anticuerpos: 0,01  $\mu$ g/ml

Dado que las proporciones relativas de fucosa estaban en el orden YB2/0 < CHO/d < NS0, la cadena de azúcar producida en el anticuerpo producido por las células YB2/0 presentó el contenido más bajo de fucosa como también se muestra en los presentes resultados.

### **Ejemplo 6 Análisis de la cadena de azúcar del anticuerpo producido por las células CHO/dhfr:**

Se prepararon cadenas de azúcar tratadas con PA a partir de anticuerpos anti-hIL-5R  $\alpha$  purificado injertados en la RDC producidos por células CHO/dhfr, y el análisis de HPLC en fase inversa se llevó a cabo utilizando una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu) (Fig. 9). En la Fig. 9, un tiempo de elución de 35 a 45 minutos correspondía a cadenas de azúcar que no tienen fucosa y un tiempo de elución de 45 a 60 minutos correspondía a las cadenas de azúcar que tienen fucosa. Al igual que en el caso del anticuerpo producido por células NS0 de mieloma de ratón, el anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC producido por CHO/dhfr celular tenía menos contenido en cadena de azúcar sin fucosa que el anticuerpo producido por células YB2/0 de mieloma de rata.

**Ejemplo 7 Separación de anticuerpos con gran actividad de ADCC:**

El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC producido por mieloma de rata YB2/0 células se separó utilizando una columna de lectina que se une a las cadenas de azúcar que tienen fucosa. HPLC se llevó a cabo utilizando LC-6A producido por Shimadzu a un caudal de 1 ml/min y a temperatura ambiente como temperatura de la columna. Después del equilibrado con tampón Tris-sulfato 50 mM (pH 7,3), se inyectó el anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  purificado injertado en la RDC y a continuación se eluyó mediante un gradiente de densidad lineal (60 minutos) de  $\alpha$ -metilmanósido 0,2 M (producido por Nakalai Tesque). El anticuerpo anti-hIL-5R  $\alpha$  injertado en la RDC se separó en la fracción no adsorbida y la fracción adsorbida. Cuando se tomaron muestras de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida y se determinó su actividad de unión a hIL-5R  $\alpha$ , presentaron actividad de unión similar (Fig. 10, gráfico superior). Cuando se determinó la actividad de ADCC, la fracción no adsorbida presentó mayor actividad de ADCC que la de la porción de la fracción adsorbida (Fig. 10, gráfico inferior). Además, las cadenas de azúcar tratadas con PA se prepararon a partir de la fracción no adsorbida y una parte de la fracción adsorbida, y el análisis de HPLC inversa se llevó a cabo utilizando una columna CLC-ODS (fabricada por Shimadzu) (Fig. 11). La fracción no adsorbida era un anticuerpo que tiene principalmente cadenas de azúcar sin fucosa, y la porción de la fracción adsorbida era un anticuerpo que tiene principalmente cadenas de azúcar que contienen fucosa.

**Ejemplo 8 Determinación del producto de transcripción del gen  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) en la estirpe celular del anfitrión:***(1) Preparación de ADNc monocatenario proveniente de varias estirpes celulares*

Unas células CHO/DG44 provenientes de ovario de hámster chino se pusieron en suspensión en medio IMDM (producido por Life Technologies) enriquecido con 10% de SBF (producido por Life Technologies) y 1 $\times$  concentración de suplemento HT (producido por Life Technologies) y se inoculó en un matraz T75 para cultivo de adhesión de células (producido por Greiner) a una densidad de 2  $\times$  10<sup>5</sup> células/ml. Además, las células YB2/0 provenientes de mieloma de rata se pusieron en suspensión en medio RPMI1640 (producido por Life Technologies) enriquecido con 10% de SBF (producido por Life Technologies) y glutamina 4 mM (producida por Life Technologies) y se inocularon en un matraz T75 para cultivo de células en suspensión (fabricado por Greiner) a una densidad de 2  $\times$  10<sup>5</sup> células/ml. Estas células se cultivaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, y 1  $\times$  10<sup>7</sup> células de cada célula anfitriona se recuperaron en el primer, segundo, tercero, cuarto y quinto día para extraer el ARN completo utilizando RNAeasy (producido por QUIAGEN).

El ARN completo se disolvió en 45  $\mu$ l de agua esterilizada, se mezcló con 0,5 U/ $\mu$ l de RQ1 DNasa sin RNasa (producido por Promega) y 5  $\mu$ l de tampón acoplado 10  $\times$  DNasa y 0,5  $\mu$ l de inhibidor de RNasin ribonucleasa (producido por Promega), seguido de reacción a 37°C durante 30 minutos. Después de la reacción, el ARN completo se purificó de nuevo utilizando RNAeasy (producido por QUIAGEN) y se disolvió en 50  $\mu$ l de agua esterilizada.

Según el Sistema de preampliación SUPERScript™ para la síntesis de la primera cadena de ADNc (producido por Life Technology), 3  $\mu$ g de cada ARN completo obtenido se sometieron a una reacción de transcripción inversa en un sistema de 20  $\mu$ l utilizando oligo (dT) como cebador para de este modo sintetizar ADNc. Se utilizó una solución de 1  $\times$  concentración de la solución después de la reacción de transcripción inversa para la clonación de FUT8 y  $\beta$ -actina provenientes de cada célula anfitriona, y una solución después de la reacción de transcripción inversa además diluida 50 veces con agua se utilizó para la determinación de los la cantidad de transcripción de cada gen utilizando la RCP competitiva, y cada una de las soluciones se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

*(2) Preparación de los respectivos fragmentos parciales de ADNc de FUT8 de hámster chino yFUT8 de rata*

Los respectivos fragmentos parciales de ADNc de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata se obtuvieron como se describe a continuación. En primer lugar, se diseñaron los cebadores (mostrados en la SEC. ID. n° 1 y SEC. ID. n° 2) específicos para las secuencias de nucleótidos comunes en un ADNc de FUT8 humano (*Journal of Biochemistry*, 121, 626 (1997)) y un ADNc de FUT8 porcino (*Journal of Biological Chemistry*, 271, 27810 (1996)).

A continuación, utilizando una ADN polimerasa ExTaq (producida por Takara Shuzo), 25  $\mu$ l de una solución de reacción constituida por tampón ExTaq (producido por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 mM de cada uno de los cebadores específicos anteriores (SEC ID n° 1 y SEC. ID. n° 2), y 1  $\mu$ l de cada uno de los ADNc proveniente de células CHO y el ADNc proveniente de células YB2/0, cada uno obtenido en el 2º día de cultivo en (1), se preparó, y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). La RCP se llevó a cabo en condiciones en las que, después de calentar a 94°C durante 1 minuto, un ciclo consistente en reacciones a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos se repite 30 ciclos y a continuación, la solución de reacción se calienta a 72°C durante 10 minutos. Cada fragmento ampliado específico de 979 pb obtenido por RCP se conectó a un plásmido pCR2.1 utilizando TOPO TA Cloning Kit (producido por Invitrogen) para obtener un fragmento parcial de ADNc respectivo que contenía plásmido de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata (CHFT8-pCR2.1 o YBFT8-pCR2.1).

Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada ADNc obtenido utilizando DNA Sequencer 377 (producido por Perkin Elmer) y BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (producido por Parkin Elmer) para confirmar que los ADNc obtenidos codifican las secuencias parciales del marco de lectura abierto (ORF) de FUT8 de hámster chino y de FUT8 de rata (mostradas en la SEC. ID. n° 3 y n° 4).

### (3) Preparación de ADNc con $\beta$ -actina de hámster chino y con $\beta$ -actina de rata

Dado que se considera que el gen de  $\beta$ -actina se transcribe constantemente en cada célula y su cantidad de transcripción es casi la misma entre las células, la cantidad de transcripción del gen de  $\beta$ -actina se determina como patrón de la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc proveniente de las respectivas células.

Se obtuvieron  $\beta$ -actina de hámster chino y  $\beta$ -actina de rata por el procedimiento siguiente. En primer lugar, un cebador directo (mostrado en SEC. ID. n° 5) específico para una secuencia común que contiene un codón de iniciación de traducción y cebadores inversos (mostrados en la SEC. ID. n° 6 y SEC. ID. n° 7) específicos para la secuencia respectiva que contiene un codón de terminación de la traducción se diseñaron a partir de una secuencia genómica de  $\beta$ -actina de hámster chino (GenBank, U20114) y de una secuencia genómica de  $\beta$ -actina de rata (*Nucleic Acid Research*, 11, 1759 (1983)).

A continuación, utilizando una ADN polimerasa, se preparó KOD (producido por TOYOBO), 25  $\mu$ l de una solución de reacción constituida por tampón de KOD n° 1 (producido por TOYOBO), dNTP 0,2 mM,  $MgCl_2$  1 mM, 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores específicos de genes anteriores (SEC. ID. n° 5 y SEC. ID. n° 6, o SEC. ID. n° 5 y SEC. ID. n° 7), 5% de DMSO, y 1  $\mu$ l de cada uno de los ADNc provenientes de células CHO y el ADNc proveniente de células YB2/0, cada una obtenida en el 2° día de cultivo en (1), y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). La RCP se llevó a cabo en unas condiciones en las que, después de calentar a 94°C durante 4 minutos, un ciclo consistente en las reacciones a 98°C durante 15 segundos, 65°C durante 2 segundos y 74°C durante 30 segundos, se repite 25 ciclos. El terminal 5' de cada fragmento ampliado específico de 1128 pb obtenido por la RCP se fosforiló utilizando MEGALABEL (producido por Takara Shuzo) y a continuación se digirió con una enzima de restricción, *EcoRV*, y el fragmento resultante (2,9 Kb) se conectó a pBluescript II (KS(+)) (producido por Stratagene) utilizando Ligation High (producido por Toyobo) para obtener un plásmido que contiene un ORF completo de los respectivos ADNc de  $\beta$ -actina de hámster chino o de  $\beta$ -actina de rata (CHAc-pBS o YBac-pBS).

La secuencia de nucleótidos obtenida de los respectivos ADNc se determinó utilizando DNA Sequencer 377 (producido por Perkin Elmer) y BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (producido por Perkin Elmer) para confirmar que codifican respectivamente secuencias completas de ORF de ADNc de  $\beta$ -actina de hámster chino y de  $\beta$ -actina de rata.

### (4) Preparación de la secuencia de referencia patrón e interna

Con objeto de medir la cantidad de transcripción del ARNm del gen FUT8 en células productoras, se preparó en primer lugar una curva de calibración.

Como patrón FUT8 que debe utilizarse en la curva de calibración, los plásmidos, CHFT8-pCR2.1 y se YBFT8-pCR2.1, obtenidos en (2) mediante la inserción de fragmentos parciales de ADNc respectivos, FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata en pCR2.1 se digirieron con una enzima de restricción, *EcoRI*, y los fragmentos resultantes de ADN se utilizaron después de convertirlos en cadenas lineales.

Como patrón interno que debe utilizarse en la determinación de FUT8, entre CHFT8-pCR2.1 y se YBFTS-pCR2.1, pCR2.1-CHFT8d y YBFTBd-pCR2.1 obtenidos suprimiendo 203 pb entre *Scal-HindIII* de secuencias de nucleótidos internas de FUT8 de hámster chino o FUT8 de rata se digirieron con la enzima de restricción, *EcoRI*, y los fragmentos de ADN resultantes se utilizaron después de convertirlos en cadenas lineales.

Como patrón de la cantidad de ARNm transcrito desde el gen de  $\beta$ -actina en células productoras, los plásmidos CHAc-pBS y YBac-PBS obtenidos en (3) por integración del ORF completo de los respectivos ADNc de  $\beta$ -actina de hámster chino y  $\beta$ -actina de rata en pBluescript II KS (+) se digirieron respectivamente, el primero con *HindIII* y *Pst I* y el último con *HindIII* y *KpnI*, y los fragmentos de ADN resultantes se utilizaron convirtiéndoles en cadenas lineales.

Como patrón interno para la determinación de  $\beta$ -actina, entre CHAc-pBS e YBac-pBS, CHAc-pBS e YBac-pBS obtenidos suprimiendo 180 pb entre *DrallI-DrallI* de las secuencias de nucleótidos internas de  $\beta$ -actina de hámster chino y  $\beta$ -actina de rata se digirieron, la primera con *HindIII* y *PstI* y la última con *HindIII* y *KpnI*, y los fragmentos de ADN resultantes se utilizaron después de convertirlos en cadenas lineales.

### (5) Determinación de la cantidad de transcripción por RT-RCP competitiva

En primer lugar, se diseñó un conjunto de cebadores (mostrados en la SEC. ID. n° 8 y n° 9) común a la secuencia específica para las secuencias internas de las secuencias parciales de ORF de FUT8 de hámster chino y de FUT8

de rata obtenido en (2).

A continuación, se realizó la RCP utilizando una ADN polimerasa ExTaq (producida por Takara Shuzo) en 20 µl en el volumen total de una solución de reacción constituida por tampón ExTaq (producido por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 mM de cada uno de los cebadores específicos de genes anteriores (SEC. ID. nº 8 y SEC. ID. nº 9), DMSO al 5% y 5 µl de una solución diluida 50 veces de cada uno de los ADNc provenientes de respectivas estirpes de células anfitrionas obtenidas en (1) y 5 µl (10 fg) del plásmido para patrón interno. La RCP se llevó a cabo calentando a 94°C durante 3 minutos y después repitiendo 30 ciclos utilizando reacciones a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto como un ciclo.

El producto de transcripción de β-actina se determinó como se describe a continuación. Se diseñaron respectivamente Los genes específicos de los conjuntos de cebadores para las secuencias internas de los ORF completos de β-actina de hámster chino y β-actina de rata obtenidos en (3) (los primeros se muestran en la SEC. ID. nº 10 y la SEC. ID. nº 11, y el segundo en la SEC. ID. nº 12 y la SEC. ID. nº 13).

A continuación, se realizó la RCP utilizando una ADN polimerasa ExTaq (producida por Takara Shuzo) en 20 µl en el volumen total de una solución de reacción constituida por tampón ExTaq (producido por Takara Shuzo), dNTP 0,2 mM, 0,5 mM de los cebadores específicos de genes anteriores (SEC. ID. nº 10 y SEC. ID. nº 11, o SEC. ID. nº 12 y SEC. ID. nº 13), DMSO al 5%, y 5 µl de una solución diluida 50 veces de cada uno de los ADNc provenientes de la respectivas estirpes de células anfitrionas obtenidas en (1) y 5 µl (1 pg) de plásmido para el patrón interno. La RCP se llevó a cabo calentando a 94°C durante 3 minutos y después repitiendo 17 ciclos utilizando reacciones a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos como un ciclo.

Tabla 3

Gen diana	* Conjunto de cebadores	Tamaño (pb) del producto ampliado por RCP	
		Diana	Competidor
FUT8	F: 5'-GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R: 5'-CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
β-actina (hámster chino)	F: 5'-GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3' R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609
β-actina (rata)	F: 5'-GATATCGCTGCGCTCGTTCGTCGAC-3' R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609

\* F: cebador directo, R: cebador inverso

Se llevó a cabo la RCP determinativa utilizando los conjuntos de cebadores mostrados en la Tabla 3. Como resultado, el fragmento de ADN que tiene el tamaño mostrado en la columna de la diana de la Tabla 3 se amplió a partir del respectivo producto de transcripción del gen y el patrón correspondiente, y el fragmento de ADN que tiene el tamaño mostrado en la columna del competidor de la Tabla 3 se amplió a partir del patrón interno correspondiente.

Una vez que 7 µl de la solución después de la RCP se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,75%, el gel se tiñó con SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (producido por Molecular Probes). La cantidad de fragmentos de ADN ampliados se determinó calculando la intensidad de luminiscencia de cada uno de los fragmentos de ADN ampliados utilizando FluorImager SI (producido por Molecular Dynamics).

Además, la RCP se realizó cambiando la cantidad del plásmido patrón preparado en (4) a 0,1 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg, 50 fg, 100 fg y 500 fg, en lugar del ADNc proveniente de células, y se determinó la cantidad de productos ampliados. Se preparó una curva de calibración representando en un gráfico los valores medidos frente a las cantidades de plásmido patrón.

Utilizando esta curva de calibración, se calculó la cantidad de ADNc del gen de interés en cada célula a partir de la cantidad del producto ampliado cuando el ADNc completo proveniente de cada célula se utilizaba como plantilla, y la cantidad se definió como la cantidad de transcripción del ARNm en cada célula.

Las cantidades del producto FUT8 de transcripción en cada estirpe de células anfitrionas en la utilización de secuencias de FUT8 de rata como patrón y patrón interno se muestran en la Fig. 12. La estirpe de células CHO mostró una cantidad de transcripción 10 veces o más superior a la de la estirpe de células YB2/0 durante todo el periodo de cultivo. Esta tendencia se encontró también cuando se utilizaron secuencias de FUT8 de hámster chino como patrón y patrón interno.

Además, la cantidad de transcripción de FUT8 se muestra en la Tabla 4 como un valor con relación a la cantidad de producto de transcripción de β-actina.

Tabla 4

Estirpe celular	Días de cultivo				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
CHO	2,0	0,90	0,57	0,52	0,54
YB2/0	0,07	0,13	0,13	0,05	0,02

5 Mientras que la cantidad de transcripción de FUT8 de la estirpe de células YB2/0 fue de aproximadamente 0,1% de  $\beta$ -actina, la de la estirpe celular CHO fue de 0,5 a 2%.

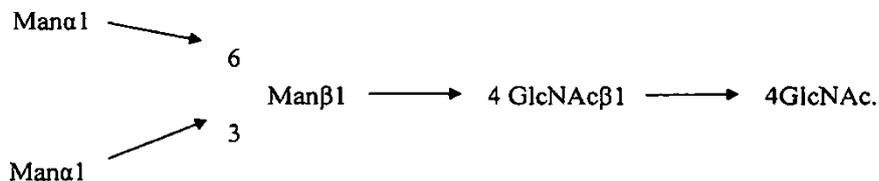
Basándose en los resultados anteriores, se demostró que la cantidad de producto de transcripción FUT8 en la estirpe celular YB2/0 fue significativamente más pequeña que la de la estirpe celular CHO.

10 **Aplicabilidad industrial**

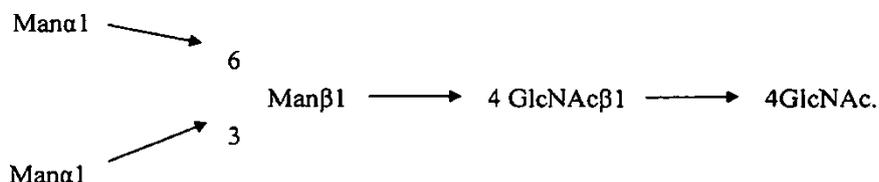
La presente exposición se refiere a una cadena de azúcar que controla la actividad de una molécula inmunofuncional, tal como un anticuerpo, una proteína o un péptido, así como un anticuerpo, una proteína o un péptido que tiene la cadena de azúcar. La presente exposición se refiere además a procedimientos para la producción de la cadena de azúcar y un anticuerpo, una proteína o un péptido que tiene la cadena de azúcar, así como a un agente de diagnóstico, un agente preventivo y un agente terapéutico que contiene estos productos como principio activo.

20 Las cláusulas numeradas siguientes son asimismo divulgadas explícitamente en la presente memoria:

1. Procedimiento para controlar la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende regular la presencia o ausencia de unión de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido que se une a la molécula inmunofuncional.
- 25 2. Procedimiento según la cláusula 1, en el que la cadena de azúcar unida a *N*-glucósido que se une a la molécula inmunofuncional comprende:



- 30 3. Procedimiento para aumentar la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende la unión de una cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra presente en la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido a una molécula inmunofuncional.
- 35 4. Procedimiento según la cláusula 3, en el que la cadena de azúcar comprende:

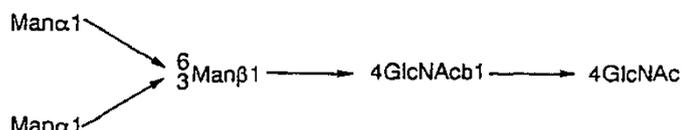


- 40 5. Procedimiento según la cláusula 3, en el que la cadena de azúcar es sintetizada en una célula que presenta una actividad enzimática baja de adición de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor o no presenta dicha actividad enzimática.
6. Procedimiento según la cláusula 5, en el que la enzima que añade la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor es una fucosiltransferasa.
- 45 7. Procedimiento según la cláusula 6, en el que la fucosiltransferasa es la  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa.
8. Procedimiento según la cláusula 3, en el que la cadena de azúcar es sintetizada en una célula de mieloma de rata.
- 50 9. Procedimiento según la cláusula 8, en el que la célula de mieloma de rata es la célula

YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL 1662).

10. Procedimiento para inhibir la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende unir una cadena de azúcar en la que la fucosa se encuentra presente en la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido a una molécula inmunofuncional.

11. Procedimiento según la cláusula 10, en el que la cadena de azúcar comprende:



12. Procedimiento según la cláusula 10, en el que la cadena de azúcar es sintetizada en una célula que presenta una actividad enzimática elevada de adición de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor.

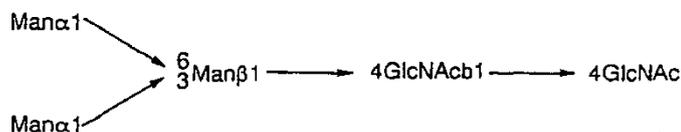
13. Procedimiento según la cláusula 12, en el que la enzima que añade la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor es una fucosiltransferasa.

14. Procedimiento según la cláusula 13, en el que la fucosiltransferasa es la  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa.

15. Procedimiento según cualquiera de las cláusulas 1 a 14, en el que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.

16. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional, que comprende una cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra presente en la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido.

17. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 16, en el que la cadena de azúcar comprende:



18. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 16, en el que la cadena de azúcar es sintetizada en una célula que presenta una actividad enzimática baja de adición de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor o no presenta dicha actividad enzimática.

19. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 18, en el que la enzima que añade la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor es una fucosiltransferasa.

20. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 19, en el que la fucosiltransferasa es la  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa.

21. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 16, en el que la cadena de azúcar es sintetizada en una célula de mieloma de rata.

22. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según la cláusula 21, en el que la célula de mieloma de rata es la célula YB2/3HL.P2.G11:16Ag.20 (ATCC CRL 1662).

23. Agente de estimulación de la actividad de una molécula inmunofuncional según cualquiera de las cláusulas 16 a 22, en el que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.

24. Molécula inmunofuncional que presenta una actividad inmunofuncional estimulada, estando unida a dicha molécula una cadena de azúcar en la que la fucosa no se encuentra presente en la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido.

25. Molécula inmunofuncional que presenta una actividad inmunofuncional inhibida, estando unida a dicha molécula una cadena de azúcar en la que la fucosa se encuentra presente en la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor de una cadena de azúcar unida a *N*-glucósido.

26. Molécula inmunofuncional según la cláusula 24, en la que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.

27. Molécula inmunofuncional según la cláusula 25, en la que la molécula inmunofuncional es un anticuerpo, una proteína o un péptido.
- 5 28. Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según la cláusula 24, que comprende utilizar una célula que presenta una actividad enzimática baja de adición de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor o no presenta dicha actividad enzimática.
- 10 29. Procedimiento según la cláusula 28, en el que la enzima que añade la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor es una fucosiltransferasa.
30. Procedimiento según la cláusula 29, en el que la fucosiltransferasa es la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa.
- 15 31. Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según la cláusula 24, en el que una célula de mieloma de rata es utilizada en el procedimiento para producir una molécula inmunofuncional que presenta una actividad inmunofuncional inhibida.
- 20 32. Procedimiento según la cláusula 31, en el que célula de mieloma de rata es la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20.
33. Procedimiento para producir la molécula inmunofuncional según la cláusula 25, en el que es utilizada una célula que presenta una actividad enzimática elevada de adición de la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor.
- 25 34. Procedimiento según la cláusula 33, en el que la enzima que añade la fucosa a la *N*-acetilglucosamina del extremo reductor es una fucosiltransferasa.
35. Procedimiento según la cláusula 34, en el que la fucosiltransferasa es la  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa.
- 30 36. Molécula inmunofuncional según la cláusula 26, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado con tumores.
37. Molécula inmunofuncional según la cláusula 36, en la que el antígeno relacionado con tumores es el gangliósido GD3.
- 35 38. Molécula inmunofuncional según la cláusula 36, en la que el anticuerpo es producido por 7-9-51 (FERM BP-6691).
- 40 39. Molécula inmunofuncional según la cláusula 26, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado a una alergia o inflamación.
- 45 40. Molécula inmunofuncional según la cláusula 39, en la que el antígeno relacionado a alergia o inflamación es una cadena  $\alpha$  de receptor de interleucina 5 humana.
- 50 41. Molécula inmunofuncional según la cláusula 39, en la que el anticuerpo es producido por nº 3 (FERM BP-6690).
42. Molécula inmunofuncional según la cláusula 26, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado a una enfermedad cardiovascular.
- 55 43. Molécula inmunofuncional según la cláusula 27, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado a una enfermedad autoinmunitaria.
44. Molécula inmunofuncional según la cláusula 26, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno relacionado a una infección bacteriana o vírica.
45. Agente para diagnosticar un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según la cláusula 36 como un principio activo.
- 60 46. Agente para tratar un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según la cláusula 36 como un principio activo.
47. Agente para prevenir un cáncer, que comprende la molécula inmunofuncional según la cláusula 36 como un principio activo.
- 65 48. Agente para diagnosticar una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según la cláusula 39 como

un principio activo.

- 5 49. Agente para tratar una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según la cláusula 39 como un principio activo.
50. Agente para prevenir una alergia o inflamación, que comprende el anticuerpo según la cláusula 39 como un principio activo.
- 10 51. Agente para diagnosticar una enfermedad cardiovascular, que comprende el anticuerpo según la cláusula 42 como un principio activo.
52. Agente para tratar una enfermedad cardiovascular, que comprende el anticuerpo según la cláusula 42 como un principio activo.
- 15 53. Agente para prevenir una enfermedad cardiovascular, que comprende el anticuerpo según la cláusula 42 como un principio activo.
- 20 54. Agente para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende el anticuerpo según la cláusula 43 como un principio activo.
55. Agente para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende el anticuerpo según la cláusula 43 como un principio activo.
- 25 56. Agente para prevenir una enfermedad autoinmunitaria, que comprende el anticuerpo según la cláusula 43 como un principio activo.
57. Agente para diagnosticar una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según la cláusula 44 como un principio activo.
- 30 58. Agente para tratar una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según la cláusula 44 como un principio activo.
59. Agente para prevenir una infección vírica o bacteriana, que comprende el anticuerpo según la cláusula 44 como un principio activo.
- 35 60. Agente para diagnosticar diversas enfermedades, que comprende el péptido o la proteína según la cláusula 26 o 27 como un principio activo.
- 40 61. Agente para tratar diversas enfermedades, que comprende el péptido o la proteína según la cláusula 60 como un principio activo.
62. Agente para prevenir diversas enfermedades, que comprende el péptido o la proteína según la cláusula 60 como un principio activo.

45 **Listado de secuencias como se ha presentado en la divisionaria**

<110> KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD

50 <120> Procedimientos de modulación de la actividad de moléculas inmunofuncionales

<130> 11200

<160> 13

55 <170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

65 <400> 1

actcatcttg gaatctcaga attgg

ES 2 601 882 T5

<210> 2  
<211> 24  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

10 <400> 2

cttgaccggt tctatctct ctcg

15 <210> 3  
<211> 979  
<212> ADN  
<213> Cricetulus griseus

20 <220>  
<400> 3

actcatcttg gaatctcaga attggegcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgtttag 60  
acctgtaagt gagacatgca cagacaggte tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120  
agtgaaggac aaaaatgttc aagtggctga gctcccatt gtagacagcc tccatcctcg 180  
tcctcettac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttga gatcgactcc tgagagtcca 240  
tggtgatcct gcagtgtggt gggtatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300  
ttggctggaa agggaaatag aagaaacac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360  
tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420  
ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaagtgga 480  
taaaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540  
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa cctctattct tggtcagctg gactacacaa 600  
ccgatacaca gaaaattcac ttggggcgt gatcctggat atacacttcc tctcccaggc 660  
tgacttcctt gtgtgtactt tttcatecca ggtctgtagg gttgcttatg aatcatgca 720  
aacactgcat cctgatgcct ctgcaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780  
aggccaaaat gccacaacc agattgcagt ttatcctcac caacctgaa ctaaagagga 840  
aatcccctg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccttga atggttactc 900  
taaagtgtc aacagaaaac taggaaaac aggctgtac ccttctaca aagtccgaga 960  
gaagatagaa acggtcaag 979

ES 2 601 882 T5

<210> 4  
<211> 979  
<212> ADN  
5 <213> Rattus

<220>

<400> 4  
10

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgtttag 60  
acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120  
agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtga gctccccatt gtagacagcc ttcacctctg 180  
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240  
tggtgatcct gcagtgtggt ggggtgccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300  
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360  
tggagtccat gtcagacgca cagacaaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420  
agagtacatg gtacatggtg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480  
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccttgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540  
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600  
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacacttcc tctctcagcc 660  
tgacttecta gtgtgtactt tttcatcca ggtctgtcgg gttgcttatg aatcatgca 720  
aacctgcat cctgatgcct ctgcaactt ccaactctta gatgacatct actatitttg 780  
aggccaaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctgaa ctgatgagga 840  
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tbtggctgga aaccttggg atggttattc 900  
taaagggtgc aacagaaaac ttgaaaaaac aggettatat cctcctaca aagtccgaga 960  
gaagatagaa acggtcaag 979

15 <210> 5  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético  
<400> 5

	aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgctgctgt	40
	<210> 6	
	<211> 40	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 6	
	athtaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg	40
15	<210> 7	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 7	
25	athtaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg	40
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 8	
	gtccatggtg atcctgcagt gtgg	24
	<210> 9	
40	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 9	
50	caccaatgat atctccaggt tcc	23
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 10	
60	gatatcgctg cgctcgtgtg cgac	24
	<210> 11	
	<211> 24	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

# ES 2 601 882 T5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

5 <400> 11  
caggaaggaa ggctggaaaa gagc 24

10 <210> 12  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético  
<400> 12  
gatatcgctg cgctcgtcgt cgac 24

20 <210> 13  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético  
<400> 13  
caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

30





FIG. 1

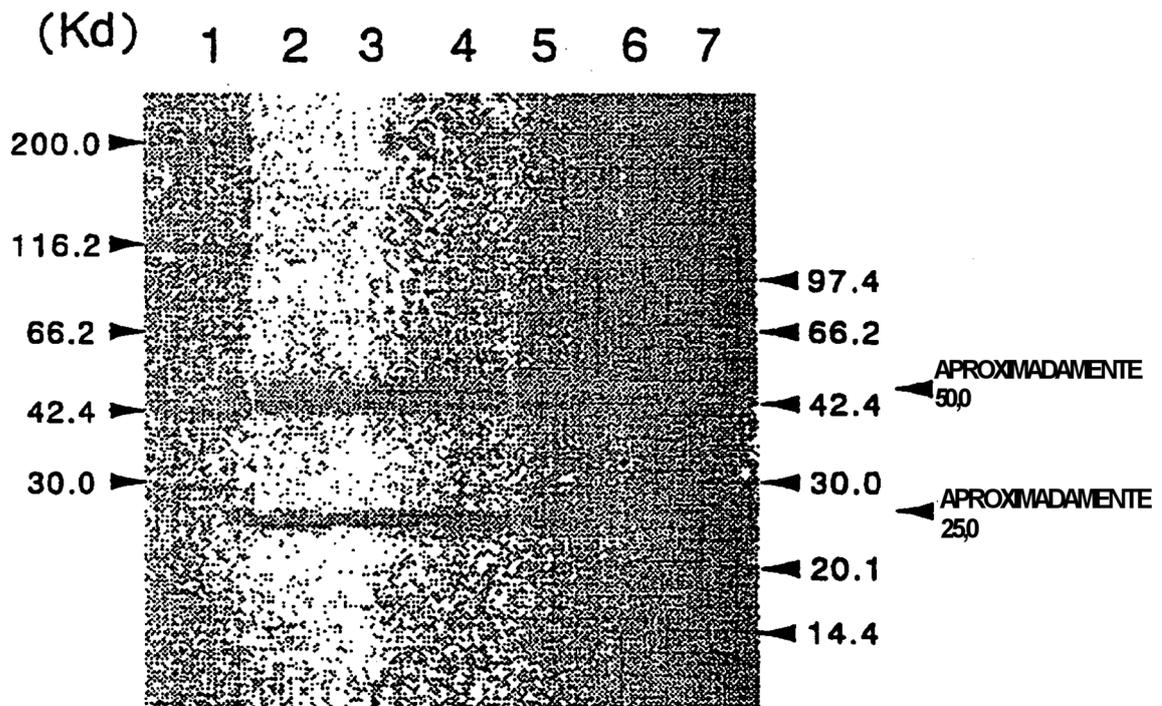
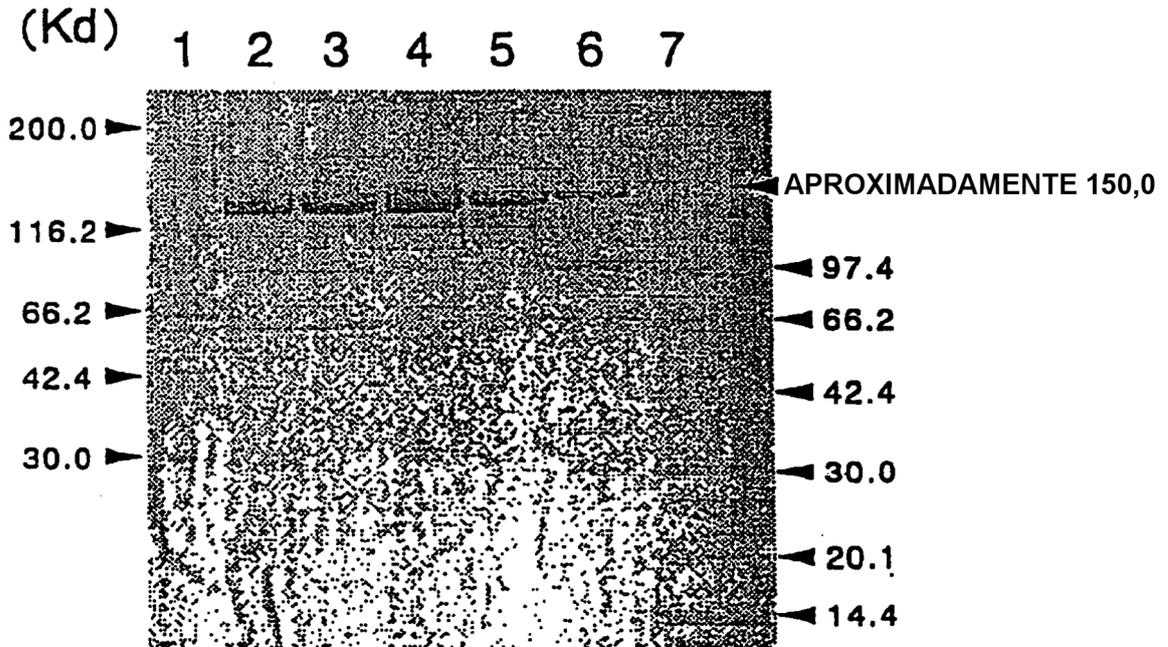


FIG. 2

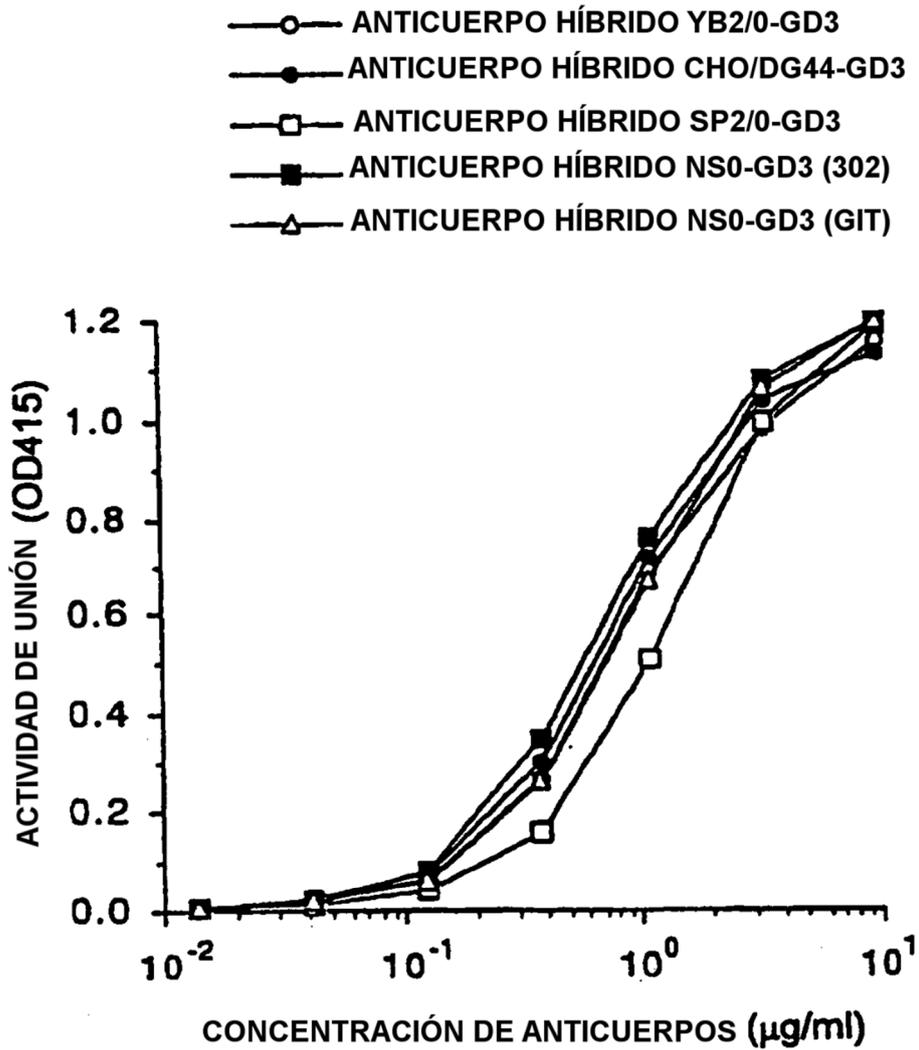


FIG. 3

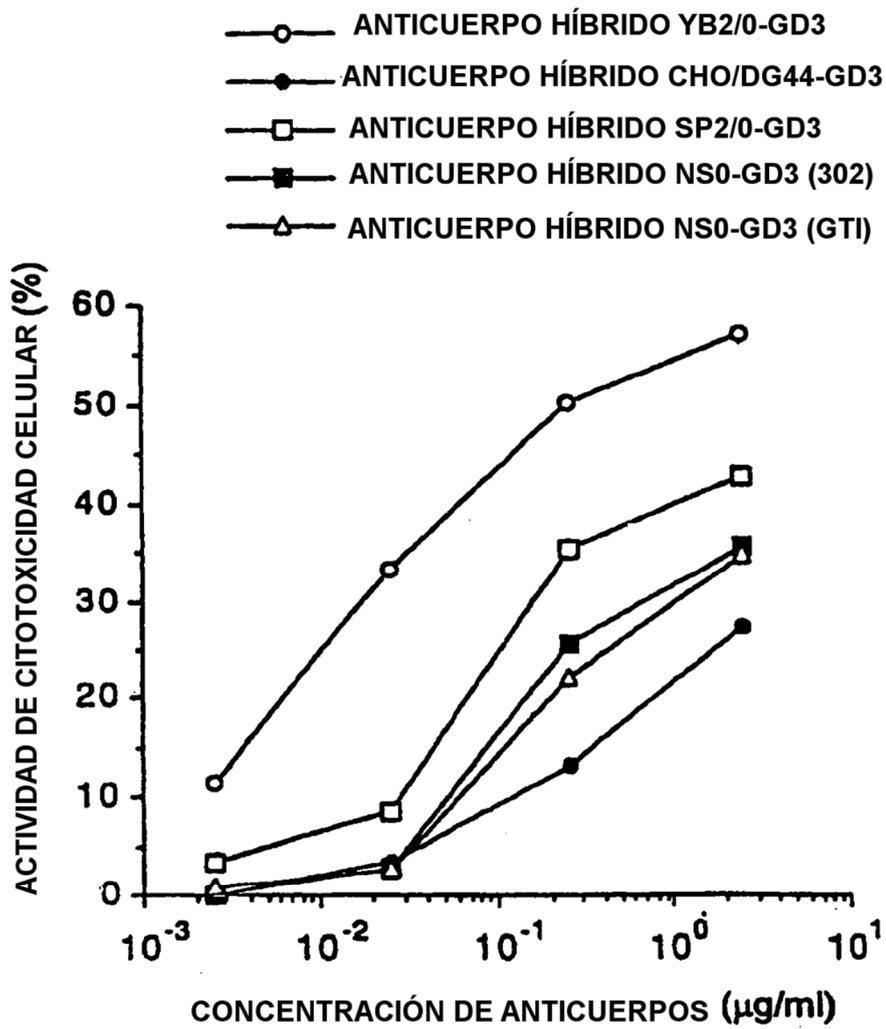


FIG. 4

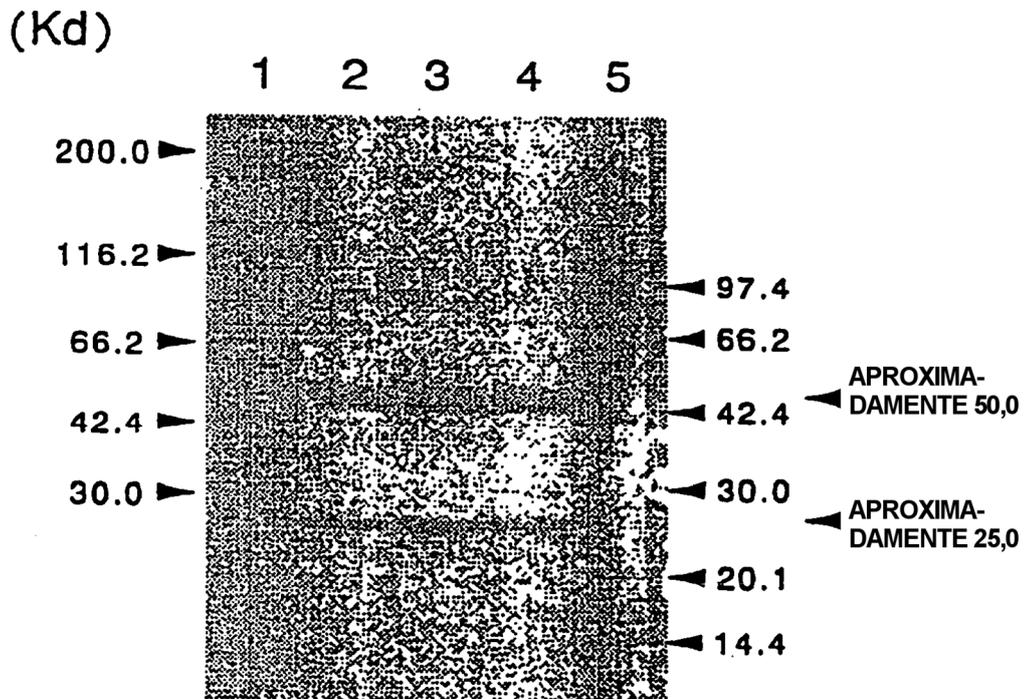
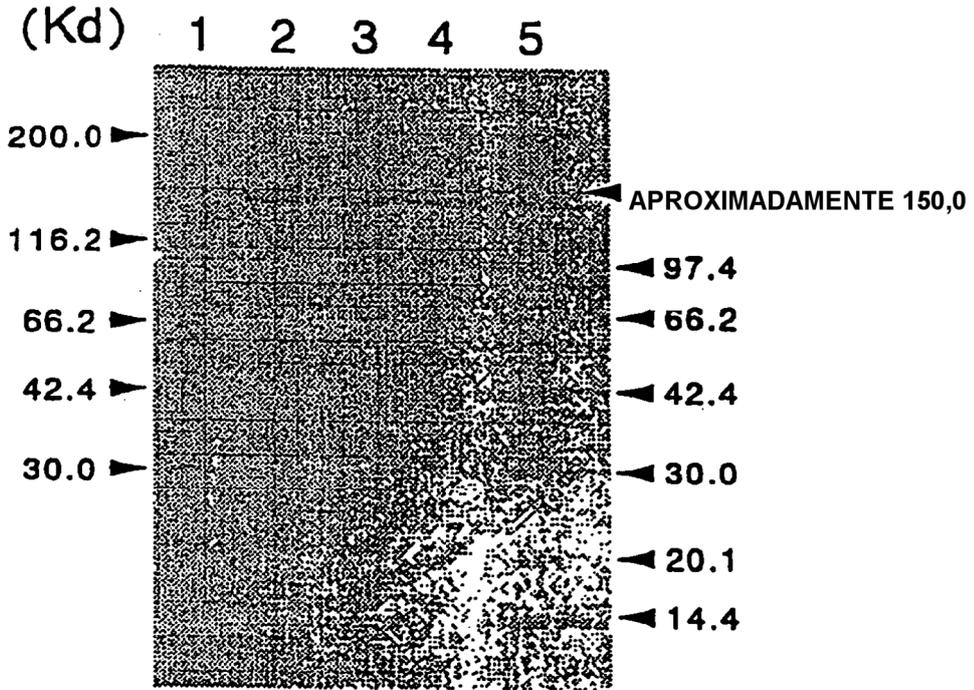


FIG. 5

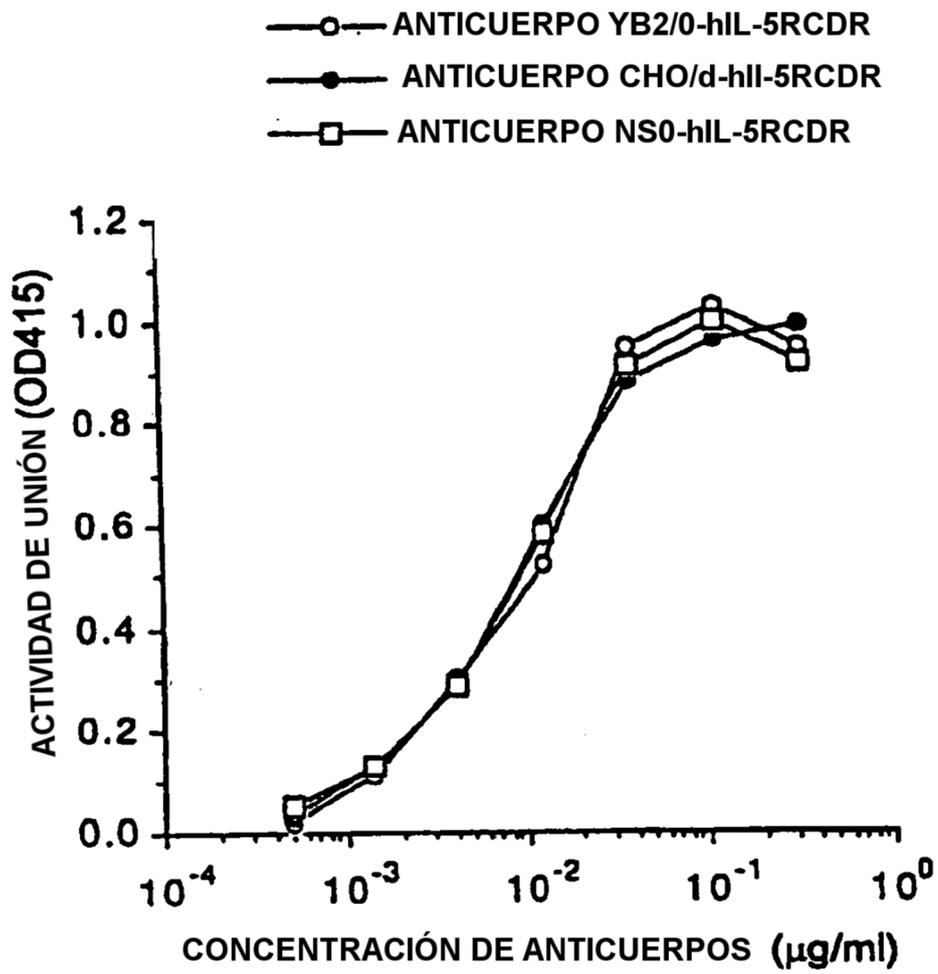


FIG. 6

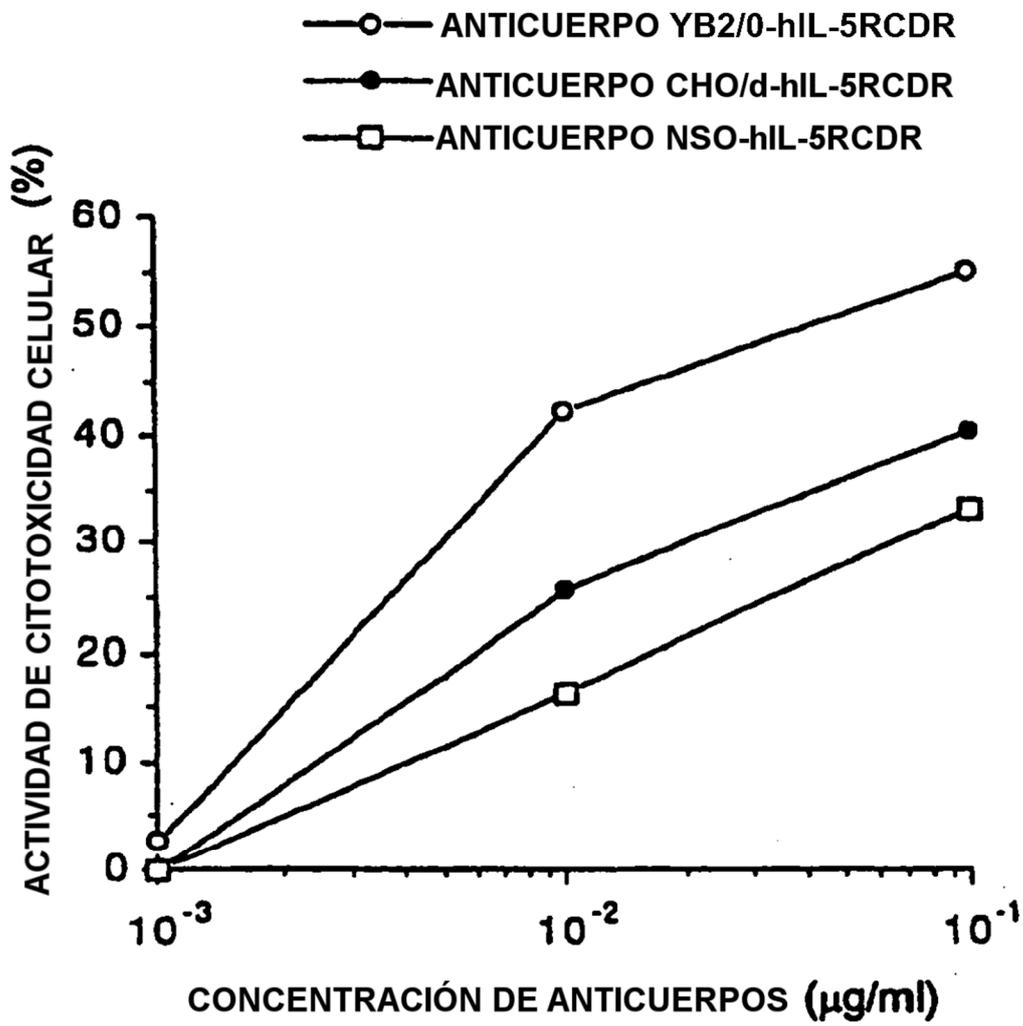
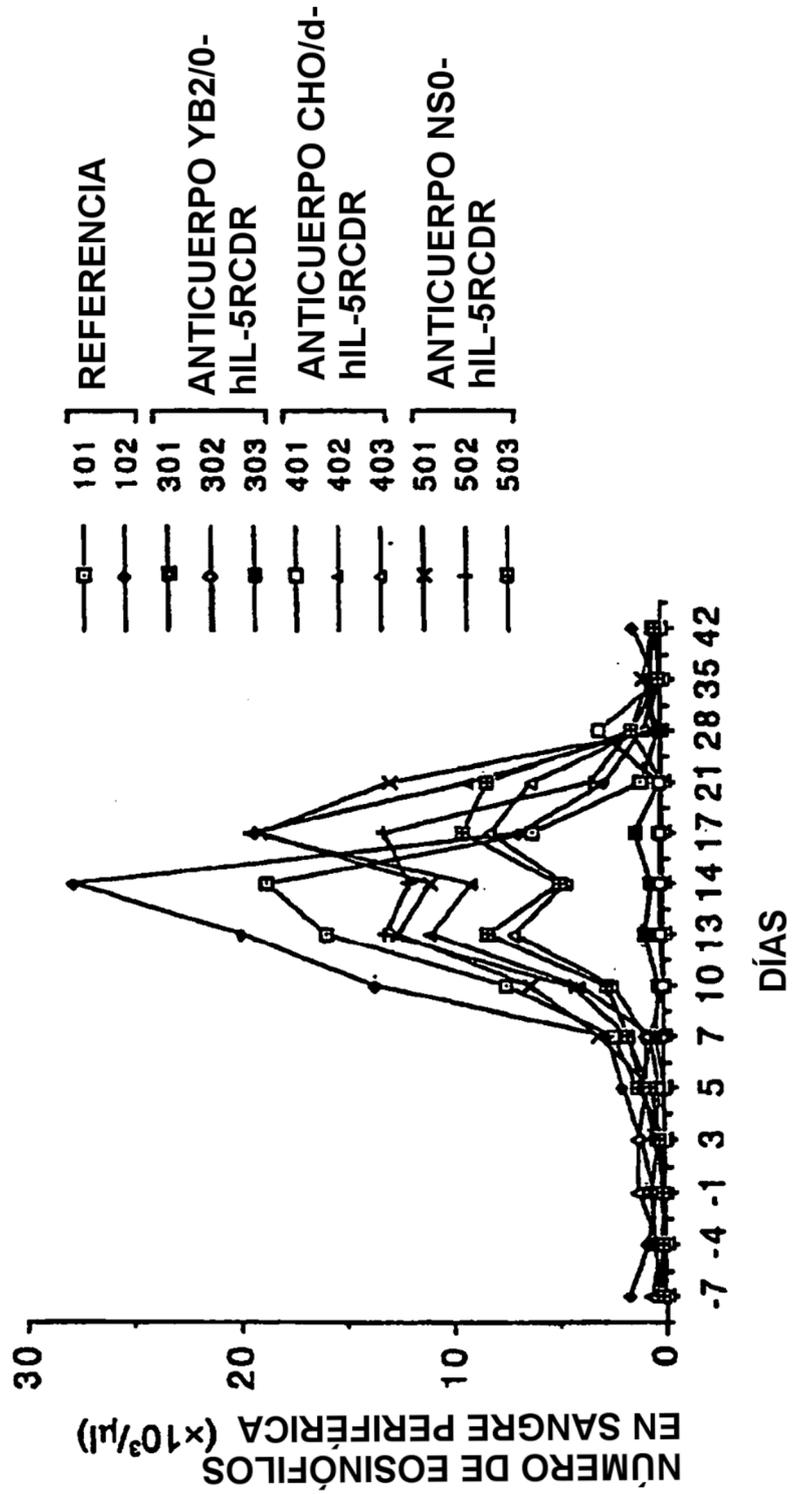
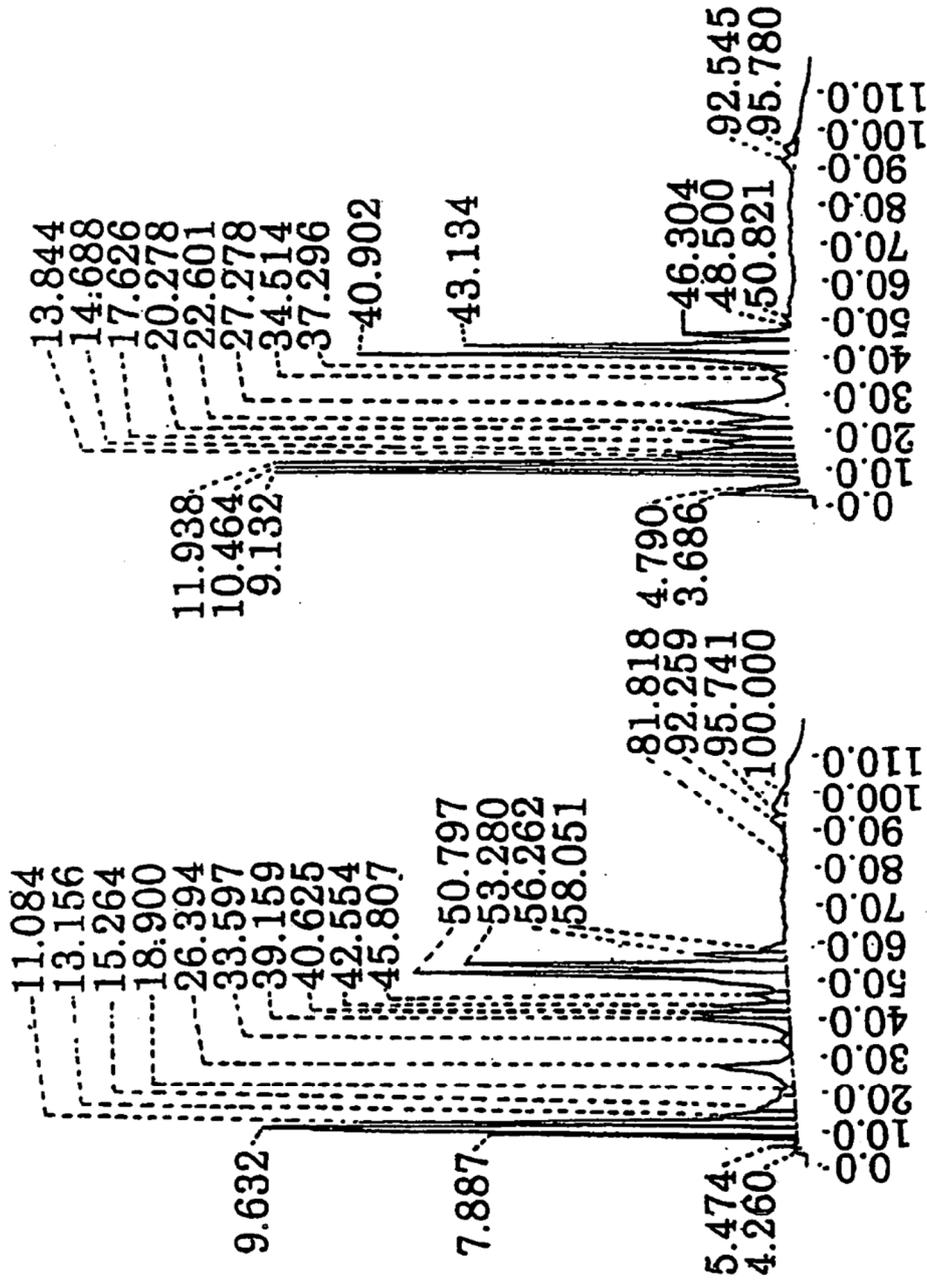


FIG. 7





ANTICUERPO NS0-hIL-5RCDR



TRAS DIGESTIÓN CON  $\alpha$ -L-FUCOSIDASA

FIG. 9

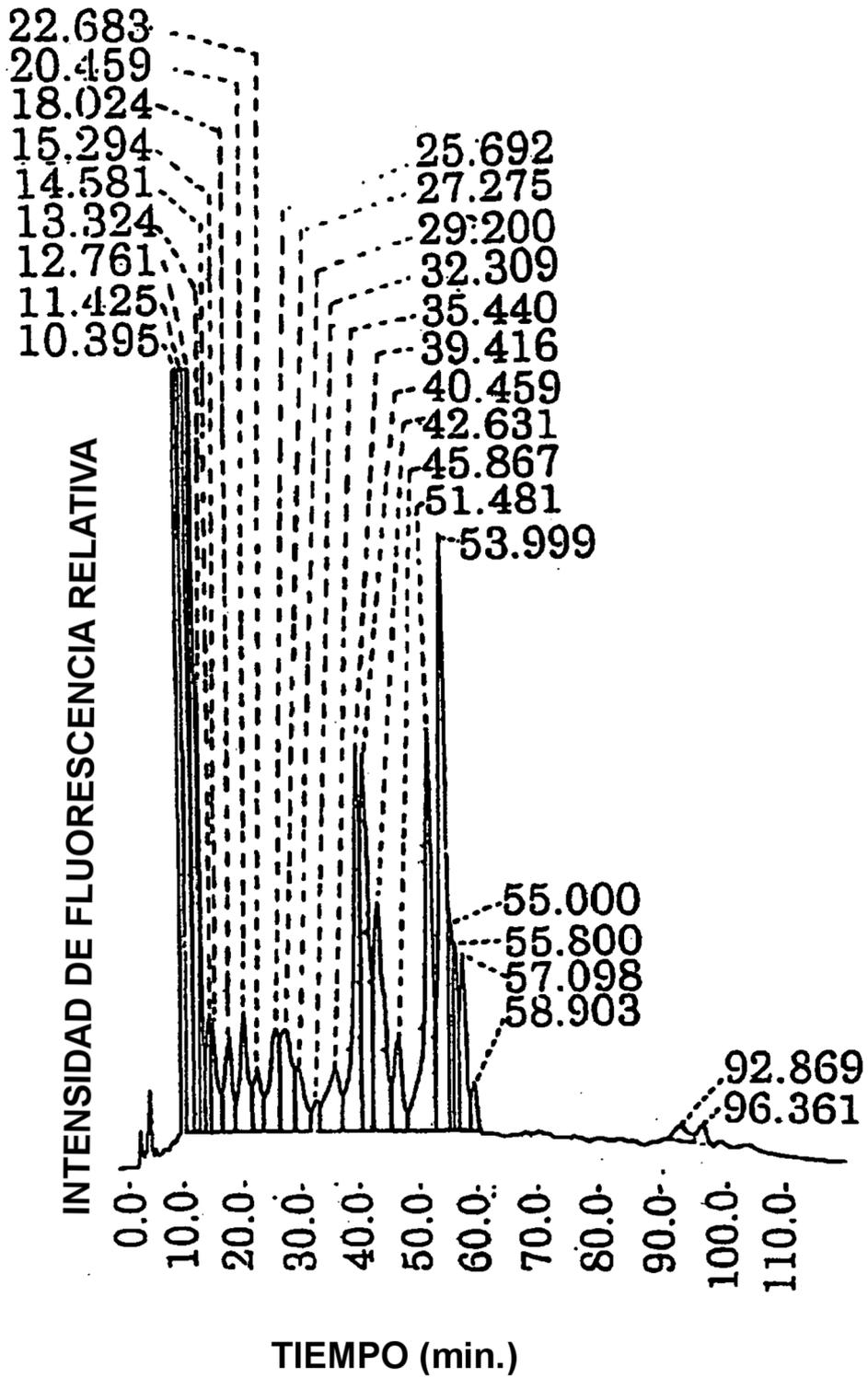


FIG. 10

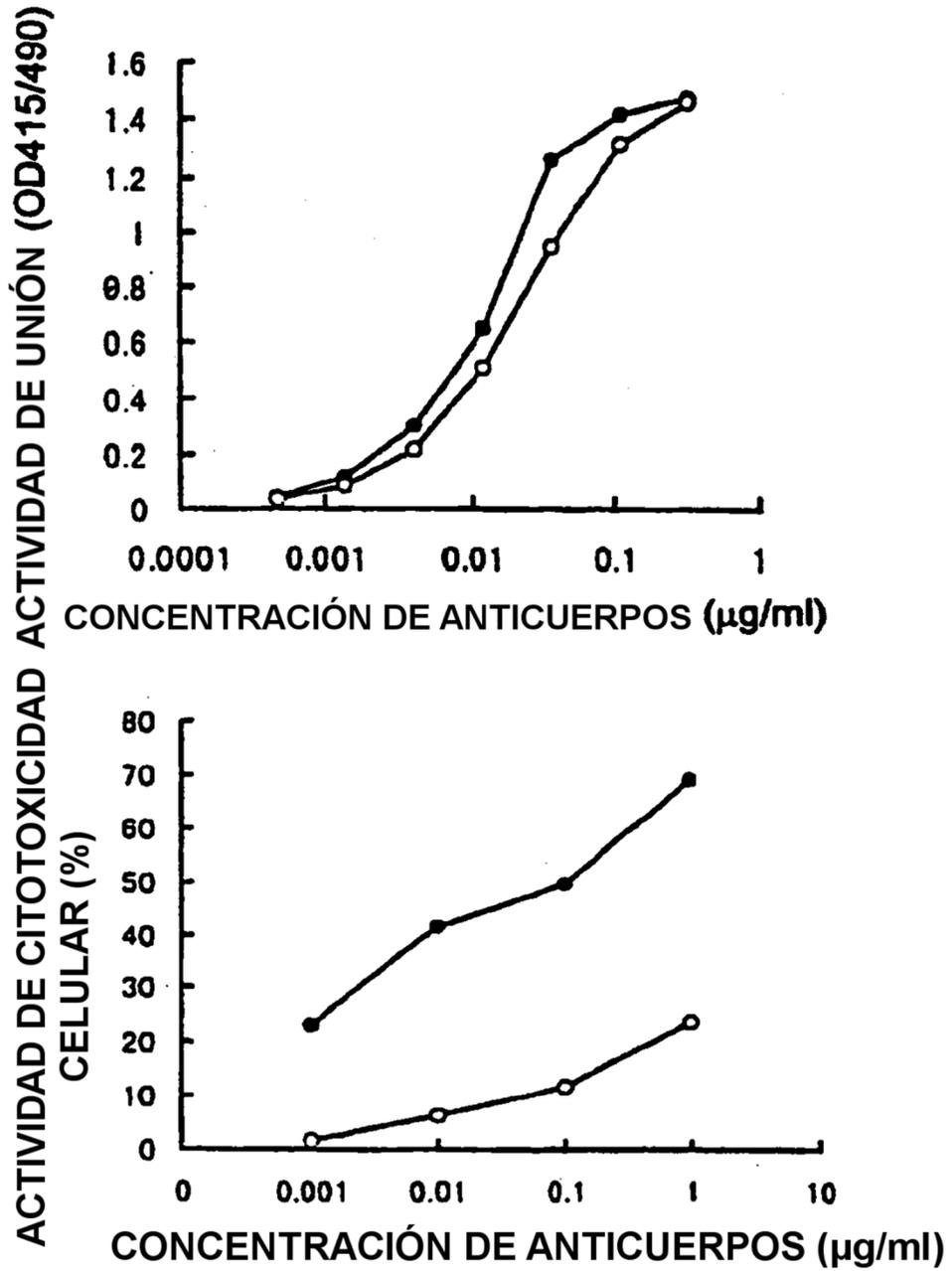


FIG. 11

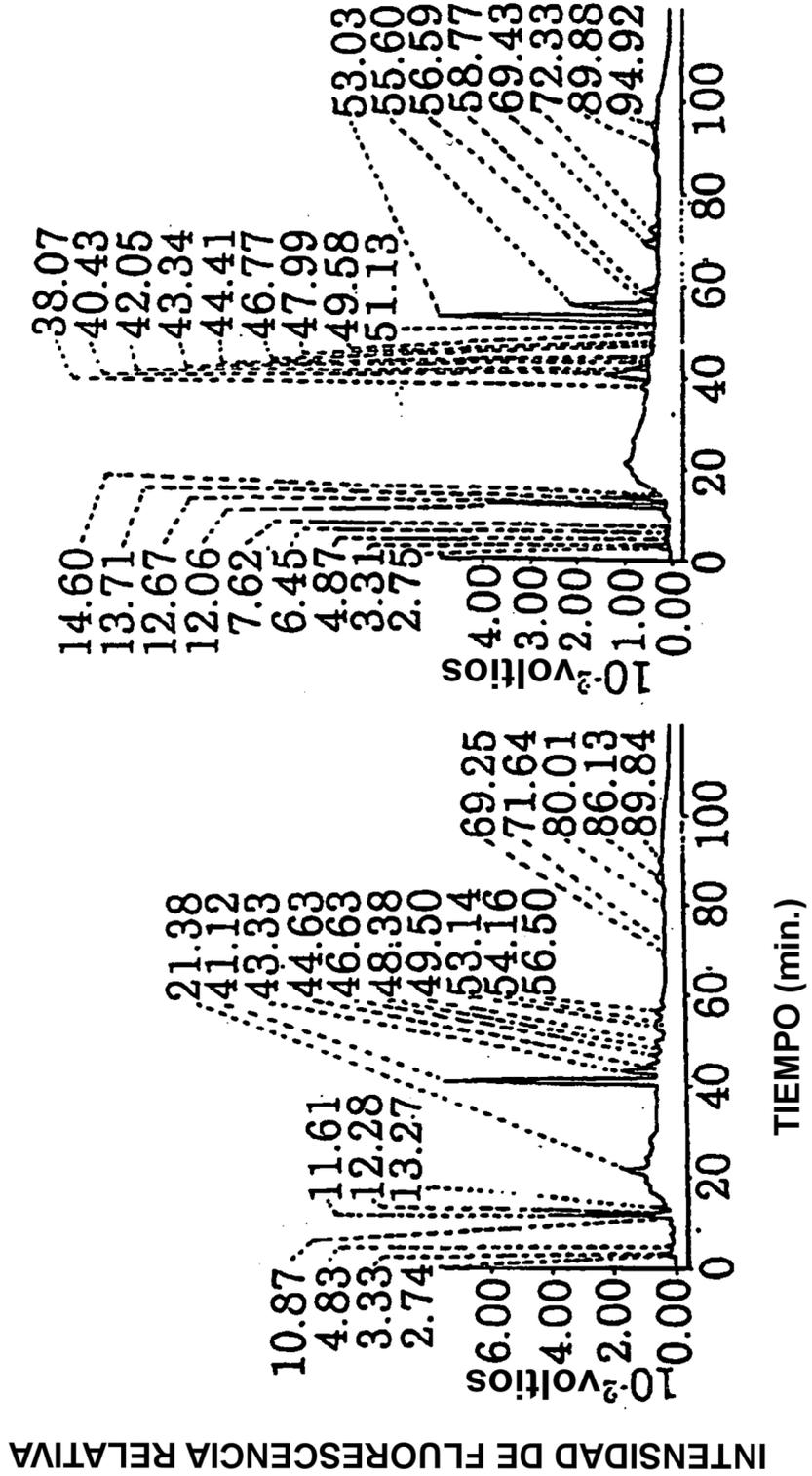


FIG. 12

