

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 964**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C07G 3/00 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2009 PCT/US2009/061810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09824038 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2347003**

54 Título: **Composiciones de galactosa alfa (1-3) galactosa**

30 Prioridad:

29.10.2008 US 109296 P

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

16.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 805 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de galactosa alfa (1-3) galactosa

5 **Campo de la invención**

La invención está dirigida a un método de síntesis enzimática de estructuras de oligosacáridos. En particular, la invención proporciona un método para sintetizar composiciones de anticuerpos, que comprenden un Gal-alfa(1,3)-Gal-beta(1-4)GlcNAc terminal.

10

Descripción de la técnica relacionada

La estructura de carbohidratos unida a una cadena peptídica se conoce como "glicano". La estructura específica de glicano presente en una proteína afecta la solubilidad, la asociación intra- e inter-polipéptida (por ejemplo, la tendencia a la agregación y la capacidad de plegarse correctamente) y, por lo tanto, su actividad funcional o enzimática. Además, el glicano puede proporcionar resistencia al péptido del ataque proteolítico y el control de la proteólisis que lleva a la conversión de formas inactivas del péptido a formas activas o de formas activas a formas inactivas. Es importante destacar que los residuos de ácido siálico terminales presentes en la molécula de glicano afectan a la vida media del péptido en el sistema circulatorio de los mamíferos. Por tanto, las estructuras de glicano proporcionan métodos para alterar importantes propiedades farmacocinéticas de agentes terapéuticos de proteínas recombinantes.

15

20

25

30

35

Los anticuerpos se producen de manera natural y recombinante como productos biofarmacéuticos en forma de glicoproteína soluble. Todos los anticuerpos producidos naturalmente poseen glicanos unidos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, cuya posición y estructura varían con el isotipo del anticuerpo. Cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de oligosacáridos N-enlazadas, que afectan de manera variable el ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de proteínas (Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). En el anticuerpo de isotipo IgG maduro, los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a un residuo de asparagina de la cadena pesada están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con la estructura principal del polipéptido. Se ha descubierto que su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, como ADCC (Lifely, M.R. et al., Glycobiology 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S.L., supra). Las estructuras principales que se encuentran en la IgG humana y otras IgG producidas de forma recombinante son las estructuras biantenarias complejas con o sin residuos de Gal expuestos (Fig. 1). La importancia biológica de las estructuras que contienen Gal terminales en las funciones de anticuerpos se ha estudiado con detalle. El grado de galactosilación de los anticuerpos se ve afectado por la edad, el género y la enfermedad (Raju, T.S., et al. Glycobiology 2000. 10(5): 477-86). En general, las estructuras de oligosacáridos son algo específicas de las especies y varían ampliamente.

40

La WO 2009/146362 describe una cepa de lavadura para la producción de proteínas con galactosa alfa-1,3-enlazada terminal.

La US 5.922.577 describe la síntesis enzimática de enlaces glicosídicos.

45

La US 2004/0191256 describe métodos y composiciones para glicoproteínas galactosiladas.

50

Típicamente, hay un procesamiento heterogéneo de las estructuras centrales de oligosacáridos unidas a un sitio de glicosilación particular de tal manera que incluso los oligosacáridos de anticuerpos monoclonales existen como múltiples glicofórmos. De igual manera, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares productoras de anticuerpos, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada cultivada en diferentes condiciones de cultivo.

55

Los anticuerpos expresados en algunas líneas celulares de roedores (como las células huésped derivadas de mieloma de roedor NS/0 y SP2/0) contienen a menudo oligosacáridos terminados con residuos de alfa-galactosa. Los residuos de galactosa están enlazados a los penúltimos residuos de galactosa en un hidroxilo de la tercera posición de carbono de azúcar, enlace alfa(1-3). Ni las células humanas ni las de hámster expresan la alfa-galactosiltransferasa activa y los humanos tienen hasta un 1% de anticuerpos circulantes dirigidos contra el producto enzimático de la alfa 1,3-galactosiltransferasa (Gal alfa 1-3Gal beta 1-4GlcNAc), también llamado antígeno Galili (GaMi, U., Clark, M.R., Shohet, S.B., Buehler, J. y Macher, BA (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1369-1373). La ausencia de epítomos alfa 1-3Gal de células humanas debido al silenciamiento del gen para la enzima alfa 1,3 galactosiltransferasa, que participa en la glicosilación de glicoconjugados de la membrana celular en mamíferos no primates, prosimios y monos del Nuevo Mundo, parece haberse producido en primates del Viejo Mundo hace 20-30 millones de años (Galili et al. 1988 J Biol Chem. 263(33):17755 -62). La fuente del rechazo de los órganos porcinos trasplantados a humanos también se ha rastreado hasta el antígeno alfa-Gal.

65

Además de la naturaleza antigénica del trisacárido Gal alfa (1-3)Gal beta(1-4)GlcNAc, se desconoce el

efecto biológico de los oligosacáridos alfa-galactosilados sobre la función del anticuerpo. Como los oligosacáridos presentes en los anticuerpos son altamente heterogéneos, es difícil establecer si la alfa-galactosa presente en las preparaciones de anticuerpos terapéuticas afecta la bioactividad. En un informe, N-glicanos no Fc-enlazados presentes en la región variable (unión de antígenos) de un anticuerpo terapéutico proporcionaron inmunogénicos (Chung et al. 2008 New Engl J Med 358:1109-17) y el antígeno reactivo se identificó como Gal-alfa-1,3-Gal.

Por lo tanto, una preparación de anticuerpos homogéneamente alfa 1-3galactosilados que puede usarse para estudiar la importancia biológica de los epítomos de alfa-galactosa sobre las funciones de anticuerpos y pK sería útil para determinar el impacto biológico de estos glicanos en preparaciones de anticuerpos terapéuticas producidos por células huésped no de primates.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un método para obtener una preparación de anticuerpos homogéneamente alfa-galactosilados produciendo una estructura de oligosacáridos alfa-galactosilados que comprende un Gal-alfa(1,3)-Gal-beta(1,4)GlcNAc terminal en un anticuerpo, en donde el método comprende:

(a) mezclar un anticuerpo, una galactosa activada, un metal divalente seleccionado del grupo que consiste de Mn^{2+} , Ca^{2+} , y Zn^{2+} , y alfa(1,3) galactosiltransferasa, y una beta(1-4)galactosiltransferasa en un medio acuoso dentro de un único recipiente para formar un medio de reacción acuoso; y

(b) mantener dicho medio de reacción acuoso a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 a una temperatura de aproximadamente 25° C a aproximadamente 40° C durante un periodo de tiempo suficiente para que dicho anticuerpo se glicosile.

En la presente se divulga un método para la síntesis de oligosacáridos que contienen Gal alfa(1-3)Gal beta(1-4)GlcN Ac en una única reacción. En la presente también se divulgan preparaciones sustancialmente homogéneas que comprenden un oligosacárido que contiene Gal alfa(1-3)Gal beta(1-4)GlcN Ac.

En un aspecto para formar una estructura de oligosacárido alfa-galactosilado que comprende un Gal-alfa(1,3)-Gal-beta(1-4)GlcNac terminal incluye los pasos de:

(a) mezclar los siguientes ingredientes en un medio acuoso dentro de un único recipiente para formar un medio de reacción acuoso:

- i) una molécula aceptora de GlcNAc;
- ii) una fuente de UDP-Gal;
- iii) un metal divalente seleccionado del grupo que consiste de Mn^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} ;
- iv) una alfa(1-3)galactosiltransferasa; y
- v) una beta(1-4)galactosiltransferasa; y

(b) mantener dicho medio de reacción acuoso a un valor de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 a una temperatura de aproximadamente 25° C a aproximadamente 40° C durante un período de tiempo suficiente para que dicho aceptador se glicosile.

En un aspecto, el oligosacárido alfa-galactosilado es una estructura biantenaria. En un aspecto específico, la estructura biantenaria del oligosacárido alfa-galactosilado es un N-glicano de un polipéptido. En un aspecto, el polipéptido es la cadena pesada de una inmunoglobulina.

Las preparaciones homogéneas que comprenden oligosacárido que contiene Gal-alfa(1-3)Gal-beta(1-4)GlcNAc pueden usarse para estudiar la naturaleza antigénica del epítomo terminal de trisacárido y otras respuestas biológicas a la presencia del epítomo en varios sistemas humanos y no humanos. Las preparaciones pueden mezclarse para formar un componente menor pero definido de la preparación de oligosacárido para tales estudios. Las preparaciones pueden usarse como material de partida para preparaciones de oligosacáridos con mayor complejidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DEL DIBUJO

La **Fig. 1** muestra la estructura biantenaria básica de las principales estructuras de oligosacáridos que se encuentran en una preparación de IgG aislada recombinante y de origen natural, donde los residuos de sacáridos que se muestran en negrita son residuos centrales y los que se muestran en fuente normal representan posiciones que varían en base al entorno sintético, como el origen de la célula huésped, el entorno nutricional de la célula huésped y el procesamiento o degradación posterior a la secreción: biseccionar GlcNAc, alfa 1-6 fucosilación del núcleo de GlcNAc, y sialilación de estructuras galactosiladas (alfa 2,6-sialilación).

Las **Figs. 2A-2C** muestran cromatogramas de una separación por HPLC de fase normal de oligosacáridos liberados de la preparación de partida de IgG (Fig. 2A); la IgG después de la reacción con UDP-Gal en presencia de beta 1, 4galactosiltransferasa (Fig. 2B); o la IgG después de la reacción con UDP-Gal en presencia de beta 1,4galactosiltransferasa y alfa-galactosiltransferasa (Fig. 2C).

Las **Figs. 3A-3C** muestran un seguimiento del análisis MALDI-TOF-MS de oligosacáridos liberados de muestras de IgG.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Abreviaturas

α 1,3GT, α -1,3-galactosiltransferasa; α 2,3ST, α -2,3-sialiltransferasa; β 1,4GT, β -1,4-galactosiltransferasa; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; CDC, citotoxicidad dirigida por el complemento; CMP-Sia, citidina monofosfato, ácido N-acetilneuramínico; fuc = fucosilo; gal = galactosa; GalNac = N-acetilgalactosa; Glc = glucosilo; IgG, inmunoglobulina G; Man = manosilo; MALDI-TOF-MS, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por láser/desorción asistida por matriz; MHX, ácido micofenólico, hipoxantina, xantina.; NANA, isómero de ácido N-acetilneuramínico del ácido siálico; NGNA, isómero de ácido N-glicolilneuramínico del ácido siálico; PNGasa F, péptido Nglucosidasa F; RP-HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; Sia, ácido siálico; UDP-Gal, uridina difosfato galactosa; UDP-GlcNAc, uridina difosfato N-acetilglucosamina.

Definiciones

Se pretende que los términos "anticuerpo", "inmunoglobulina" o "IgG" abarquen anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de los mismos incluyendo, sin limitación, miméticos de anticuerpos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o porción del mismo, y retiene funciones mediadas por Fc incluyendo, pero no limitadas a: unión de ligandos, unión a receptores de Fc (por ejemplo, Fc γ RI (CD64) Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIIA (CD 16A) y FcRn), complemento de unión (por ejemplo, C1q), ADCC y CDC.

El término "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc" como se usa en la presente se refiere a una proteína monomérica, dimerica o heterodimerica que tiene por lo menos un dominio CH2 y CH3 de inmunoglobulina, y preferiblemente un dominio de dimerización, como una región bisagra de inmunoglobulina. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar por lo menos una parte de la región dimerica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo), en el que está presente un sitio de glicosilación N-enlazado en uno de los dominios CH2.

Los "sitios de glicosilación" se refieren a residuos de aminoácidos que son reconocidos por una célula eucariota como localizaciones para la unión de residuos de azúcar. Los aminoácidos donde se unen los carbohidratos, como el oligosacárido, son típicamente residuos de asparagina (enlace N), serina (enlace O) y treonina (enlace O). El sitio específico de unión se señala típicamente mediante una secuencia de aminoácidos, referida en la presente como "secuencia del sitio de glicosilación". La secuencia del sitio de glicosilación para la glicosilación N-enlazada se conoce como -Asn-X-Ser- o -Asn-X-Thr- (NXT), donde X puede ser cualquiera de los aminoácidos convencionales, distintos de prolina. La secuencia del sitio de glicosilación predominante para la glicosilación enlazada a O es: -(Thr o Ser)-X-X-Pro-, donde X es cualquier aminoácido convencional. La secuencia de reconocimiento para los glicosaminoglicanos (un tipo específico de azúcar sulfatada) es -Ser-Gly-X-Gly, donde X es cualquier aminoácido convencional. Los términos "enlazado a N" y "enlazado a O" se refieren al grupo químico que sirve como sitio de unión entre la molécula de azúcar y el residuo de aminoácido. Los azúcares enlazados a N están unidos a través de un grupo amino; Los azúcares enlazados a O están unidos a través de un grupo hidroxilo. Sin embargo, no todas las secuencias del sitio de glicosilación en una proteína están necesariamente glicosiladas; algunas proteínas se secretan tanto en formas glicosiladas como no glicosiladas, mientras que otras están completamente glicosiladas en una secuencia del sitio de glicosilación pero contienen otra secuencia del sitio de glicosilación que no está glicosilada. Por lo tanto, no todas las secuencias de los sitios de glicosilación que están presentes en un polipéptido son necesariamente sitios de glicosilación donde los residuos de azúcar están realmente unidos. La N-glicosilación inicial durante la biosíntesis inserta el "carbohidrato central" u "oligosacárido central" (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton (ed.), W.H. Freeman and Company, Nueva York).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente es una forma específica de proteína de fusión que contiene Fc en la que el dominio de unión a ligando retiene una homología sustancial con por lo menos uno de un dominio variable de anticuerpo de cadena pesada o ligera de por lo menos una especie de anticuerpo animal y el anticuerpo es producido por un único tipo de célula huésped que puede ser un hibridoma o transfectoma pero más típicamente, donde los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo han sido reclonados usando métodos recombinantes estándar y reintroducidos en la célula huésped.

Por "NANA" o "ácido siálico" se entiende un miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetil neuramínico (ácido 2-ceto-5-

acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico I (Neu5Ac, NeuAc o NANA) Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (NGNA, Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Esta forma es prevalente en las glicoproteínas de roedores y fuentes microbianas. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos 9-sustituídos como un 9-O-C-6 acilo Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9 azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia de los ácidos estáticos, ver, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer Verlag, Nueva York (1992)).

Glicanos en cuestión

La descripción se refiere a composiciones que son oligosacáridos, también denominadas estructuras de "glicano". Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, ya sea que el sacárido en el extremo reductor sea o no un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en la presente con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha. Todos los oligosacáridos descritos en la presente se describen con el nombre o la abreviatura del sacárido no reductor (por ejemplo, Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace del anillo, la posición del anillo del sacárido reductor involucrado en el enlace, y luego el nombre o abreviatura del sacárido reductor (por ejemplo, GlcNAc). El enlace entre dos azúcares puede expresarse, por ejemplo, como 1,3,1 \rightarrow 3, o (1-3). Cada sacárido es una piranosa.

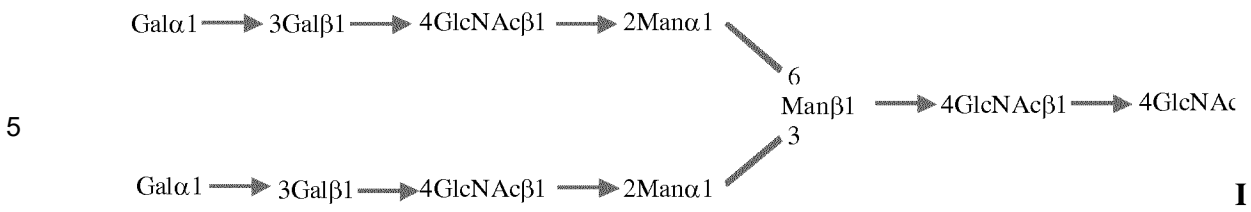
Las estructuras de oligosacáridos divulgadas en la presente descripción se producen en un anticuerpo expresado como oligosacáridos N-enlazados. La "glicosilación N-enlazada" se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a través de GlcNAc a un residuo de asparagina en un polipéptido o cadena de lípidos. Los oligosacáridos N-enlazados en anticuerpos de mamíferos contienen una "estructura central" de Man alfa (1-6) [Man alfa (1-3)] Manbeta (1-4) GlcNAcbeta(1-4)GlcNAcbeta-R común también referida como G-2 (Fig. 1). Por lo tanto, en la estructura central descrita, R representa un residuo de asparagina de la glicoproteína producida enlazada al primer sacárido del carbohidrato: 2-acetamido-N-(L-aspart-4-il) -2- desoxi-b-D-glucopiranosilamina, es decir, N⁴-(N-acetil-b-D-glucosaminil)asparagina, que también se abrevia como (GlcNAc-)Asn (paréntesis alrededor de los carbohidratos colocados al lado del símbolo para el residuo de asparagina indica que la sustitución está en la N en el cuarto átomo que es la cadena lateral de amina). Los oligosacáridos que tienen cadenas ramificadas se consideran carbohidratos complejos y la presente descripción se refiere a estructuras complejas de carbohidratos biantenarios también referidas como la porción de glicano de una glucoproteína, como las unidas al dominio CH2 de las inmunoglobulinas.

La modificación natural de los polipéptidos con oligosacáridos se produce en el aparato de Golgi de las células eucariotas, particularmente las células eucariotas capaces de añadir un "oligosacárido central" N-enlazado que contiene por lo menos un residuo de manosa y/o capaz de añadir un azúcar O-enlazado, a por lo menos una secuencia del sitio de glicosilación en por lo menos un polipéptido expresado en dicha célula, particularmente, una proteína secretada. Por tanto, las células capaces de formar glicoproteínas contienen por lo menos una glicosiltransferasa que cataliza la unión de un residuo de azúcar a una secuencia del sitio de glicosilación en una proteína o polipéptido. Las células de mamíferos son típicamente capaces de glicosilar proteínas, mientras que otras células eucariotas, como las células de insectos y la levadura, pueden glicosilar proteínas secretadas pero con estructuras alternativas o truncadas en comparación con las producidas por células de mamífero.

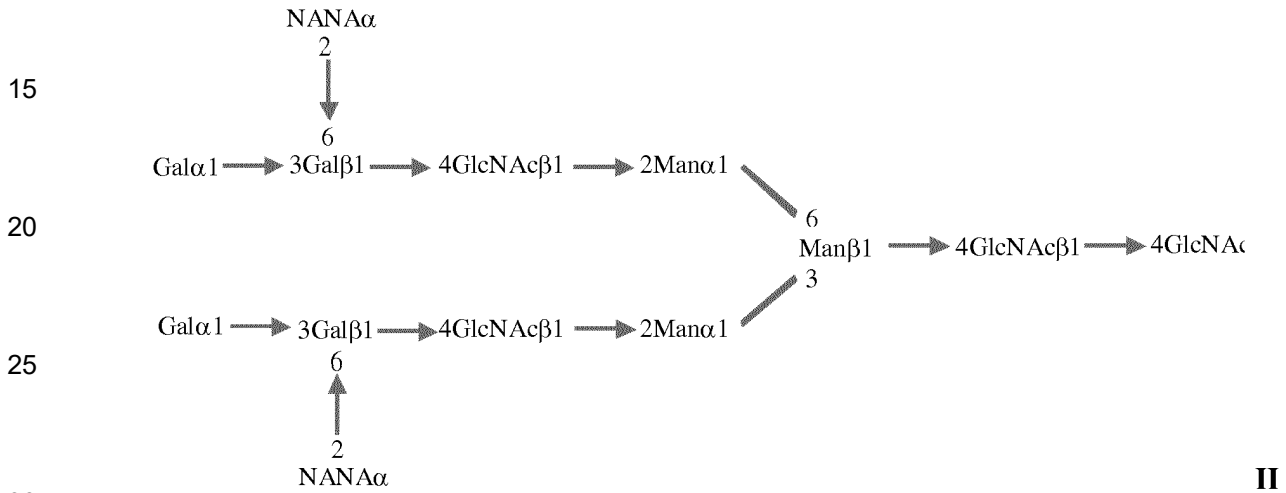
Composiciones

El producto del método de la divulgación es una preparación sustancialmente homogénea que comprende una estructura de oligosacárido alfa-galactosilado que comprende un Gal-alfa(1,3)-Gal-beta(1-4)GlcNAc terminal. La estructura de oligosacáridos alfa-galactosilados puede estar enlazada a proteínas o lípidos, a través de las funcionalidades de amina o hidroxilo presentes en las proteínas en la cadena lateral de residuos de asparagina, serina o treonina y grupos hidroxilo de terpenoides o ceramida, esfingolide, como fosfato de prenilo.

La descripción también se refiere a estructuras biantenarias complejas que comprenden α 1,3-enlace Gal, opcionalmente, con NANA α 2,6-enlazada. En una realización, la estructura producida por el método de la invención se muestra en la siguiente fórmula (I):



10 En un aspecto diferente, la estructura producida por el método de la invención se muestra en la siguiente fórmula (II):



30 Será evidente para los expertos en la técnica que dentro de la presente invención se incluyen variaciones de las fórmulas I y II que son posibles junto con variantes, como las representadas en la Fig. 1, que incluyen la presencia de fucosa central y GlcNAc que bisecciona.

35 Métodos para elaborar las composiciones

40 Se han descrito una serie de glicosiltransferasas y, en algunos casos, métodos mediante los cuales las enzimas pueden usarse concurrentemente en lugar de secuencialmente para afectar la síntesis de un bisacárido de especificidad estéreo y regional. Se han identificado más de 200 glicosiltransferasas de varias fuentes y no se ha explorado exhaustivamente la capacidad de seleccionar combinaciones compatibles para la síntesis dirigida de estructuras de oligosacáridos específicas. La invención describe que mediante la selección de enzimas de galactosiltransferasas con especificidad predeterminada, es posible transferir dos moléculas de galactosa en serie en una única reacción a un sustrato que comprende un GlcNAc terminal que forma la estructura específica de trisacárido Gal α(1-3)Galβ (1-4) GlcNAc.

45 En un aspecto formar una estructura de oligosacárido alfa-galactosilado que comprende un Gal-alfa(1,3)-Galbeta(1-4)GlcNAc terminal incluye los pasos de:

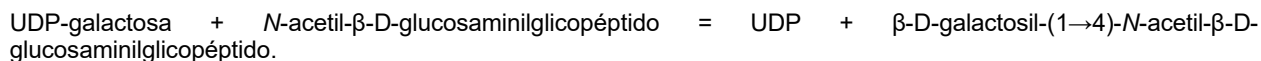
- 50 (a) mezclar los siguientes ingredientes en un medio acuoso dentro de un único recipiente para formar un medio de reacción acuoso:
- vi) una molécula aceptora de GlcNAc;
 - vii) una fuente de UDP-Gal;
 - viii) un metal divalente seleccionado del grupo que consiste de Mn²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺;
 - 55 ix) una alfa(1-3)galactosiltransferasa; y
 - x) una beta(1-4)galactosiltransferasa; y
- (b) mantener dicho medio de reacción acuoso a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 a una temperatura de aproximadamente 25° C a aproximadamente 40° C durante un período de tiempo suficiente para que dicho aceptor sea glicosilado.

60 En un aspecto, la galactosiltransferasa se aísla de una fuente natural. Por ejemplo, la beta-1,4 galactosiltransferasa de leche bovina es una fuente común de enzimas comercialmente disponibles. También están disponibles las formas recombinantes de galactosiltransferasas de bovino, porcino y otras. Las alfa-1,3 galactosiltransferasas recombinantes se han expresado con anterioridad como proteínas completas o como el dominio extracelular soluble que es una enzima soluble totalmente activa (Henion, T.R., Macher, B.A., Anaraki, F. y

Galili, U. (1994) *Glycobiology* 4, 193-201).

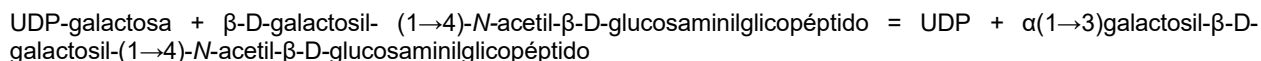
La especificidad de metal divalente para activar las alfa(1-3) y beta(1-4)-galactosiltransferasas es similar o por lo menos se superpone en entornos in vitro e incluye Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} (Zhang et al. 2001 *J. Biol. Chem.*, 276(15): 11567-11574). El metal o los metales están presentes a 1-25 mM.

Las galactosiltransferasas y glicosaminoglicano galactosiltransferasa ejemplares de *Dictyostelium discoideum* (E.C. 2.4.1.74), glucosaminilgalactosilglucosilceramida β -galactosiltransferasa de mamífero (E.C. 2.4.1.86); β -N-acetilglucosaminil-glicopéptido β -1,4-galactosiltransferasa (E.C. No. 2.4.1.38) también denominada N-acetilactosamina sintasa (E.C. 2.4.1.22) capaz de catalizar la reacción



En otro aspecto, la galactosiltransferasa también se denomina N-acetilactosamina sintasa (E.C. 2.4.1.22) y es capaz de catalizar la transferencia de galactosa de UDP-galactosa a N-acetilglucosamina.

La $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa (E.C. No. 2.4.1.151) especialmente la del timo de ternero (Blanken et al. *J Biol Chem.* 1985 Oct 25; 260(24):12927-34) o la $+\beta$ -D-galactosil-N-acetilglucosamina- $\alpha(1,3)$ D-galactosiltransferasa porcina es capaz de catalizar la formación del antígeno trisacárido, Gal $\alpha(1-3)$ Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc. Las $\alpha(1,3)$ D-galactosiltransferasas útiles en el método de la invención son capaces de catalizar la reacción:



Para la producción de la estructura de fórmula II, puede usarse una enzima de transferencia NANA, tales enzimas incluyen Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (Ver, Kurosawa et al. *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)) y la patente de Estados Unidos 7.220.555).

Otras glucosiltransferasas particularmente útiles en la preparación de moléculasceptoras de oligosacáridos de la invención son las manosiltransferasas incluyendo la $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa, $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa, $\beta(1,4)$ manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1 y Pmt1.

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

Para aquellos aspectos en los que el método se va a poner en práctica a escala comercial, puede ser ventajoso inmovilizar la glicosiltransferasa en un soporte. Esta inmovilización facilita la eliminación de la enzima del lote de producto y la posterior reutilización de la enzima. La inmovilización de las glicosiltransferasas puede lograrse, por ejemplo, eliminando de la transferasa su dominio de unión a la membrana y uniéndolo en su lugar a un dominio de unión a la celulosa. Un experto en la técnica comprenderá que también pueden usarse otros métodos de inmovilización y se describen en la bibliografía disponible.

La glicosiltransferasa usada es específica tanto para el grupo glucosilo transferido como para el aceptor al que se transfiere el grupo glucosilo (Gal o GlcNAc). Al sintetizar oligosacáridos desde cero, los sustratos aceptores pueden ser esencialmente cualquier monosacárido u oligosacárido que tenga un residuo de sacárido terminal para el cual la glicosiltransferasa particular muestra especificidad, y el sustrato puede sustituirse en la posición de su extremo no reductor. Por tanto, el aceptor de glicósidos puede ser un monosacárido, un oligosacárido, un sacárido marcado con fluorescencia, o un derivado de sacárido, como un antibiótico de aminoglucósido, un gangliósido, un glicolípido o una glicoproteína incluyendo anticuerpos y otras proteínas que contienen Fc. En un grupo de realizaciones preferidas, el aceptor de glicósido es un oligosacárido, que cuando está beta-galactosilado comprenderá la unidad disacárido Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc, actuando de este modo como un aceptor de las alfa-galactosiltransferasas. El aceptor de sacáridos u oligosacáridos es preferiblemente,

GlcNAc
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man,
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1-3)$ Man,
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1,6)$ Man,
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1,6)$ Man $\beta(1-4)$ GlcNAc,
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1,6)$ Man $\beta(1-4)$ GlcNAc, $\beta(1-4)$ GlcNAc
 GlcNAc $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1,6)$ Man $\beta(1-4)$ GlcNAc, $\beta(1-4)$ GlcNAc-R, o

GlcNAc β (1-2) Man α (1,6) [Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2)Man α (1-3)]Man β (1-4)GlcNAc, β (1-4)GlcNAc-R.

En un aspecto particular, el aceptor de oligosacáridos está enlazado a R, donde R es un residuo de asparagina dentro del dominio CH2 de una proteína que contiene Fc. En otra realización, el azúcar terminal no reductor puede estar sustituido con un grupo informador o estar unido a un lípido como un aminofosfolípido.

La glicosiltransferasa también tendrá especificidad para el nucleótido de azúcar donante. En el caso de las galactosiltransferasas, el nucleótido de azúcar donante puede ser UDP-Gal. El uso del sustrato de azúcar activado, es decir, el fosfato de nucleósido de azúcar, puede eludirse mediante el uso de una reacción de regeneración al mismo tiempo que la reacción de la glicosiltransferasa (también conocida como sistema de reciclaje). Por ejemplo, como se enseña en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.516.665; un sistema de reciclaje de uridina difosfato que incluye (a) UDP, UTP o ambos, (b) un donante de fosfato y (c) una quinasa para transferir un grupo fosfato del donante de fosfato a UDP para formar UTP, en donde cada una de las enzimas es presente en una cantidad catalítica. Cualquiera o ambos UDP y UTP pueden estar presentes en la medida en que UDP se convierta en UTP, y después de la reacción de transferencia de glicosilo, se forme de nuevo UDP. Como UDP y UTP se interconvierten y se reutilizan, se analiza habitualmente la cantidad total de uno u otro en lugar de las cantidades para ambos. El donante de fosfato del sistema de regeneración es un compuesto fosforilado, cuyo grupo fosfato puede usarse para fosforilar UDP para formar UTP. La única limitación en la selección de un donante de fosfato es que ni las formas fosforiladas ni desfosforiladas del donante de fosfato interfieren sustancialmente con ninguna de las reacciones implicadas en la formación del sacárido aceptor glicosilado. Los donantes de fosfato son fosfoenolpiruvato (PEP) y acetil fosfato (AcOP).

Otro sistema para formar UDP-gal se enseña en la US 5.728.554 e incluye un sistema de reciclaje de sustrato donante que comprende por lo menos 1 mol de glucosa-1-fosfato por cada mol de oligosacárido de sustrato, un donante de fosfato, una quinasa capaz de transferir fosfato del donante de fosfato a los difosfatos de nucleósidos, y una pirofosforilasa capaz de formar UDP-glucosa a partir de UTP y glucosa-1-fosfato y cantidades catalíticas de UDP y una UDP-galactosa-4-epimerasa. Este sistema puede usarse con α (1,3)galactosiltransferasa (E.C. N° 2.4.1.151) y β (1,4)galactosiltransferasa (E.C. N° 2.4.1.38).

Un método alternativo para preparar oligosacáridos es mediante el uso de una glicosiltransferasa y derivados de glicosilo activados como azúcares donantes, lo que evita la necesidad de nucleótidos de azúcar como azúcares donantes, como se enseña en la Patente de Estados Unidos 5.952.203. Los derivados de glicosilo activados actúan como alternativos a los sustratos de origen natural, que son nucleótidos de azúcar caros, habitualmente difosfoazúcares de nucleótidos o monofosfoazúcares de nucleótidos en los que el fosfato de nucleótidos está α -enlazado a la posición 1 del azúcar.

Los derivados de glicósidos activados que son útiles incluyen un grupo saliente activado como, por ejemplo, flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Las realizaciones preferidas de derivados de glicósidos activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, prefiriéndose particularmente los fluoruros de glicosilo. Entre los fluoruros de glicosilo, los más preferidos son el fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosil, fluoruro de α -glucosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de alfa-N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glucosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de beta-sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo.

Los fluoruros de glicosilo pueden prepararse a partir del azúcar libre acetilando primero el azúcar y luego tratándolo con HF/piridina. Los fluoruros de glicosilo acetilados pueden desprotegerse por reacción con una base suave (catalítica) en metanol (por ejemplo, NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están disponibles comercialmente. Pueden prepararse otros derivados de glicosilo activados usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los mesilatos de glicosilo pueden prepararse mediante el tratamiento de la forma hemiacetal completamente bencilada del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

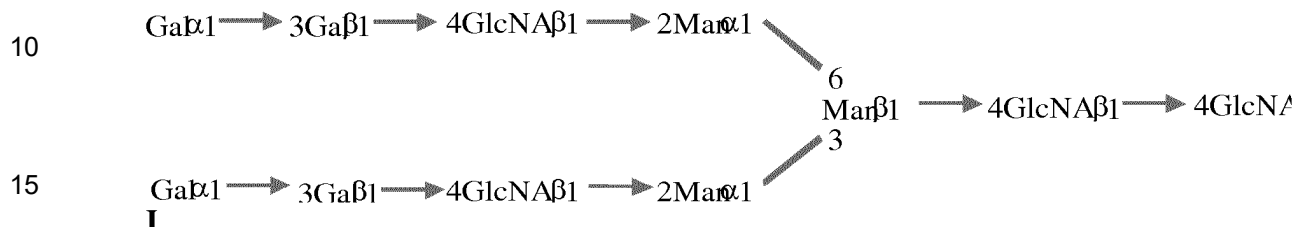
Los análogos adecuados incluyen, por ejemplo, sulfatos y sulfonatos de nucleósidos. Otros análogos más incluyen fosfatos simples, por ejemplo, pirofosfato.

Un procedimiento para modificar proteínas recombinantes producidas, por ejemplo, en células murinas en las que predomina la forma hidroxilada del ácido siálico (NGNA), es tratar la proteína con sialidasa, para eliminar el ácido siálico de tipo NGNA, seguido de galactosilación enzimática usando el reactivo UDP-Gal y beta1,4 Galtransferasa para producir glicofomas de G2 altamente homogéneas.

Un enfoque alternativo para preparar sublotos de una proteína que contiene Fc que difiere en el contenido de α -galactosa de los oligosacáridos en la región Fc es tratar una parte de una preparación de proteína que contiene Fc con enzima sialidasa, eliminando de este modo los ácidos siálicos.

Métodos de usar la invención

El método de la invención puede usarse para modificar polipéptidos que tienen una secuencia de glicosilación de consenso (NXT) que tiene una estructura de glicano central conocida como G0 (Fig. 1) a estructuras que contienen residuos beta Gal (G2) que comprenden además por lo menos un sacárido alfa-1-3 galactosilados (G2G1 o G2G2) como se muestra en la Fig. 1 y a continuación (I).



La divulgación se refiere además a preparaciones de IgG que comprenden estructuras de glicano que son sustancialmente homogéneas en forma de G2G2 como se muestra en (I), que pueden además estar fucosiladas en el GlcNAc central, o pueden tener beta-1-4 N-acetilo bisecante aminoglucosilado en el núcleo de manosa de la estructura, o pueden estar sialiladas en el mismo residuo de galactosa que está alfa-galactosilado, mediante un enlace alfa-2-6 pero no alfa-2-3 sialilado en el mismo residuo de galactosa que está alfa-galactosilado.

Las composiciones preparadas mediante el proceso de la invención son útiles como composiciones terapéuticas en las que se desea una preparación sustancialmente homogénea de moléculas de IgG que tengan glicanos en la configuración G2G2. El método de la invención puede usarse para modificar las glicoproteínas que interactúan con los receptores. En particular, la invención se refiere a la modificación de los grupos glicano en un anticuerpo terapéutico capaz de interactuar con los receptores de Fc y producir proteínas terapéuticas modificadas, por ejemplo, anticuerpos, de tal manera que la composición de las cadenas de oligosacáridos pueda optimizarse para una o más actividades biológicas in vivo.

Las composiciones preparadas mediante el proceso de la invención pueden someterse a procesamiento o modificación biológica o química adicional. Por ejemplo, los anticuerpos preparados con estructuras de glicano en la configuración G2G2 pueden modificarse para incluir alfa-2,6-sialilación. Las estructuras o modificaciones de orden superior, como PEGilación o lipidación, de uno o más de los residuos de sacárido de las composiciones producidas por el método del método enzimático de la invención están abarcadas por la divulgación.

EJEMPLO 1: GALACTOSILACIÓN DE MUESTRAS DE ANTICUERPOS

Se describe un método de preparación de IgG sustancialmente en la glicofoma G2.

Se obtuvieron β -1,4-galactosiltransferasa y UDP-Gal bovinas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La PNGasa F se obtuvo de New England Biolabs (Beverly, MA) o de Prozyme (San Leandro, CA) o de Selectin BioSciences (Pleasant Hill, CA). Las columnas de proteína A NAP-5 y HiTrap se obtuvieron de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. Las IgG recombinantes que comprenden un dominio Fc humano se produjeron en Centocor Research & Development, Inc. (Radnor, PA).

Las muestras de IgG en tampón MES 100 mM (pH 7,0) (aproximadamente 10 mg en 1,0 ml de tampón) se trataron con 50 millones de β 1,4-galactosiltransferasa bovina (de Sigma), 5 μ mol de UDP-Gal y 5 μ mol de OffMnCl_2 a 37 $^\circ$ C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de enzima y UDP-Gal y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37 $^\circ$ C. Las muestras de IgG alfa-galactosiladas se purificaron usando una columna de proteína A HiTrap. Los oligosacáridos se liberaron tratando IgG con PNGasa F y caracterizaron los oligosacáridos liberados por MALDI-TOF-MS y por NP-HPLC (HPLC de fase normal).

El análisis MALDI-TOF-MS de los glicanos liberados de la muestra de IgG inicial (control) mostró la presencia de glicanos 45% de G0, 50% de G1 y 5% de G2 junto con pequeñas cantidades de otros glicanos (Fig. 3A). El análisis NP-HPLC de glicanos liberados de la muestra de IgG no tratada no mostró cantidades apreciables de glicanos sialilados y confirmó la presencia de G0, G1 y G2 como glicanos principales (Fig. 2A). Por tanto, después de la incubación de las muestras con β -1,4-galactosiltransferasa bovina y UDP-Gal (obtenida de Sigma), tanto los análisis MALDI-TOF-MS como NP-HPLC de los glicanos liberados de la muestra de IgG galactosilada mostraron la presencia de glicano G2 solo (Figs. 2B y 3B) y la ausencia de glicanos G0 y G1 sugiriendo que la galactosilación era completa.

EJEMPLO 2: α -GALACTOSILACIÓN DE MUESTRAS ANTICUERPOS

Se preparó una preparación homogénea que contenía enlaces Gal(alfa1-3)Galβ1,4 en una preparación de IgG que comprendía el glicano de fórmula I en un único paso de reacción usando enzimas no de primate.

5 Los reactivos fueron como se describe en el Ejemplo 1 con la adición de α-galactosiltransferasa porcina recombinante obtenida de Calbiochem (San Diego, CA).

10 Las muestras de IgG en tampón MES 100 mM (pH 7,0) (~10 mg en 1,0 ml de tampón) se trataron con 50 miliunidades de cada uno de β1,4-galactosiltransferasa bovina (de Sigma) y α1,3-galactosiltransferasa, de hígado de rata recombinante, (de CalBiochem) en presencia de 5 μmol de UDP-Ga1 y 5 μmol de MnCl₂ a 37° C. Después de 24 h de incubación, se añadieron otra alícuota de β1 4-galactosiltransferasa bovina y α1,3-galactosiltransferasa de hígado de rata recombinante junto con 5 μmol de UDP-Gal. La mezcla se incubó durante 24 h más a 37° C. Las muestras de IgG beta-galactosilada y α-galactosilada se purificaron usando una columna de proteína A HiTrap. Los oligosacáridos se liberaron de las IgG por tratamiento con PNGasa F y caracterizaron los oligosacáridos liberados por MALDI-TOF-MS y por NP-HPLC.

15 Tanto los análisis MALDI-TOF-MS como NP-HPLC de los glicanos liberados de la muestra de IgG tratada mostraron la presencia de una única estructura α-galactosilada (Figs. 2C y 3C), es decir, G2α2 (Fórmula 1) y la ausencia de estructuras de G0, G1 y G2 lo que sugiere que la α-galactosilación de IgG era completa.

20

25

30

35

40

45

50

55

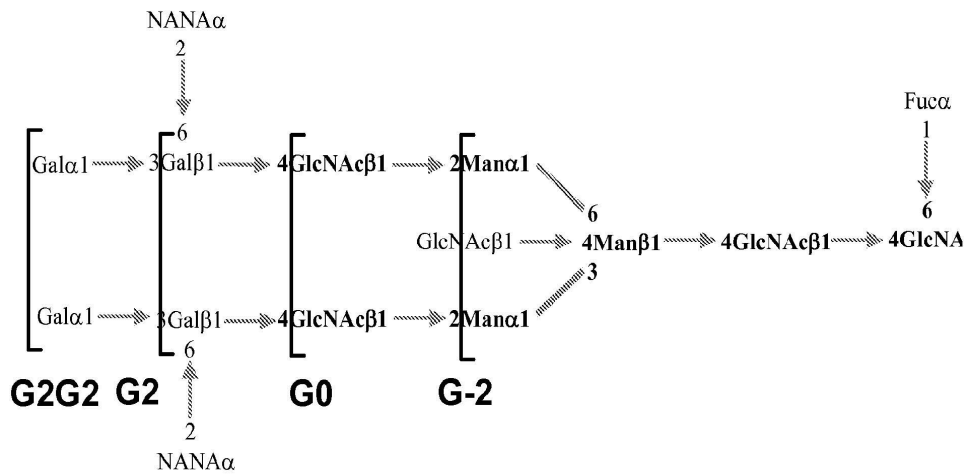
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para producir una preparación de anticuerpos homogéneamente alfa-galactosilados produciendo una estructura de oligosacáridos alfa-galactosilados que comprende un Gal-alfa(1,3)-Gal-beta(1-4)GlcNAc terminal en un anticuerpo en donde el método comprende:
- 10 (a) mezclar un anticuerpo, una galactosa activada, un metal divalente seleccionado del grupo que consiste de Mn^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} , una alfa(1-3)galactosiltransferasa y una beta(1-4)galactosiltransferasa en un medio acuoso dentro de un único recipiente para formar un medio de reacción acuoso; y
- 10 (b) mantener dicho medio de reacción acuoso a un pH de 5 a 10 a una temperatura de aproximadamente 25° C a aproximadamente 40° C durante un período de tiempo suficiente para que dicho anticuerpo se glicosile.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde la alfa(1-3)galactosiltransferasa es α -galactosiltransferasa porcina.
- 15 **3.** El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la sal metálica divalente es Mn^{2+} .
- 4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la galactosa activada es uridina difosfato-galactosa (UDP-galactosa).
- 20 **5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la beta(1-4)galactosiltransferasa es una beta1-4,galactosil transferasa de mamífero.
- 6.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la temperatura de reacción es de 37° C, el metal divalente es Mn^{2+} a una concentración de 5 mM, la concentración de UDP-galactosa es de 5 mM y la concentración de beta(1-4)galactosiltransferasa es de 50 mUnidad/ml.
- 25 **7.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es una IgG.
- 30 **8.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el aceptor de sacárido se selecciona del grupo que consiste en GlcNAc, GlcNAc β (1-2)Man, GlcNAc β (1-2)Man α (1-3)Man, GlcNAc β (1-2)Man α (1,6)Man, GlcNAc β (1-2)Man α (1,6)Man β (1-4)GlcNAc, GlcNAc β (1-2)Man α (1,6)Man β (1-4)GlcNAc, β (1-4)GlcNac, GlcNAc β (1-2)Man α (1,6)Man β (1-4)GlcNAc, β (1-4)GlcNac-R y GlcNAc β (1-2)Man α (1,6)[Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2)Man α (1-3)]Man β (1-4)GlcNAc, β (1-4)GlcNac-R.
- 35 **9.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el glicano comprende residuos de ácido alfa-2,6-siálico.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1



Fuc = fucosilo; Gal = galactosilo; Glc = glucosilo; GlcNAc = N-acetilglucosamino; Man = manosilo; y NANA = sialilo (N-acetilneuramino); donde NANA puede representarse por uno o más de ácido 5-N-acetilneuramínico (NeuAc) o ácido 5-N-glicoli-1-neuramínico (NeuGc, NGNA).

Fig. 2A

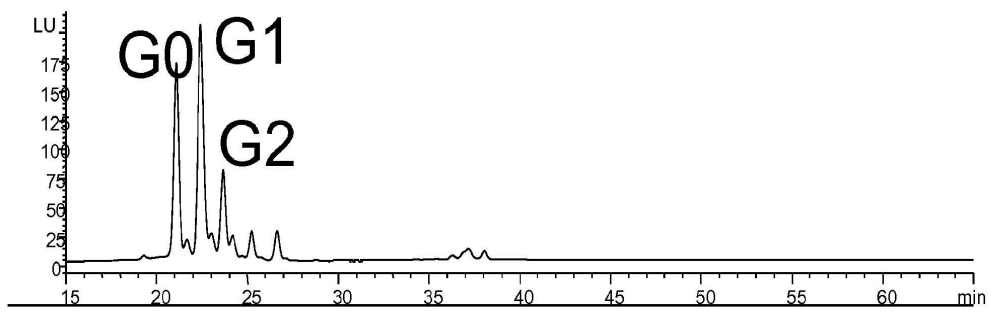


Fig. 2B

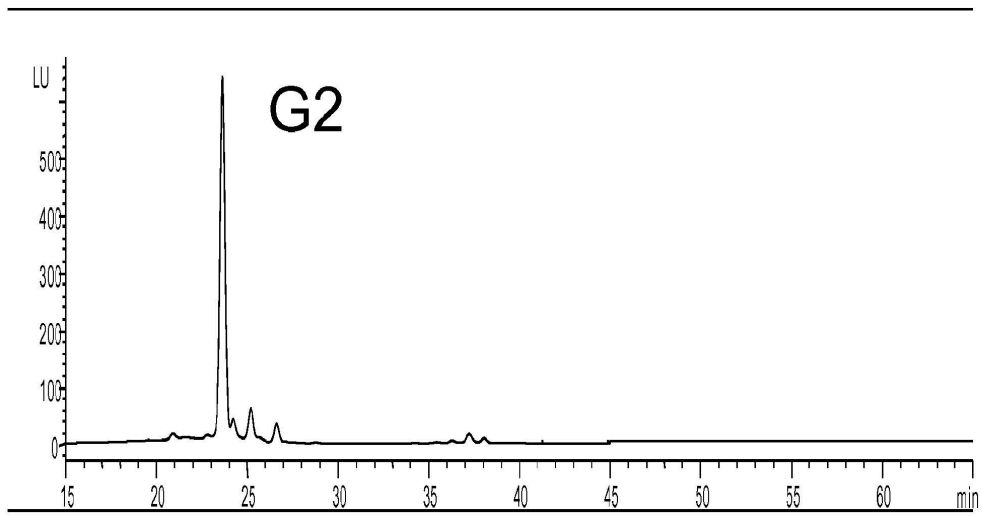


Fig. 2C

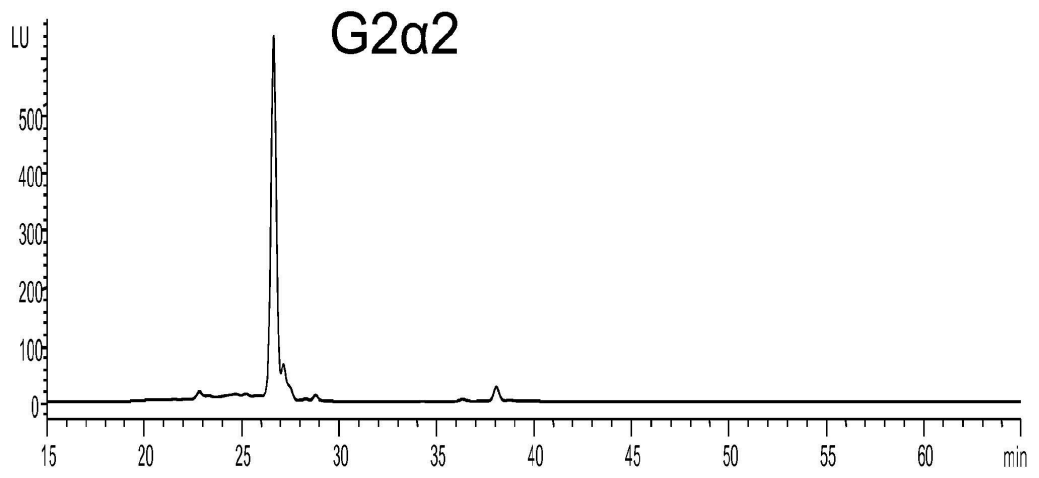


Fig. 3A

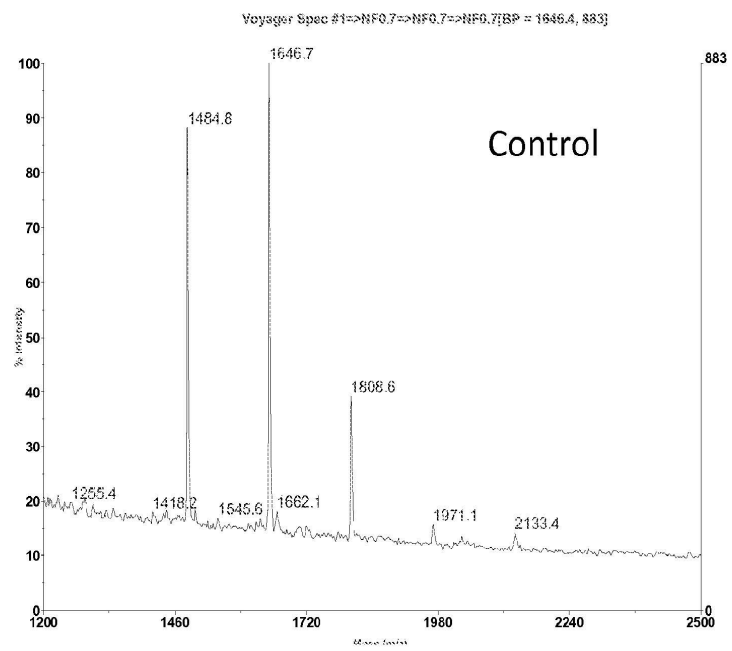


Fig. 3B

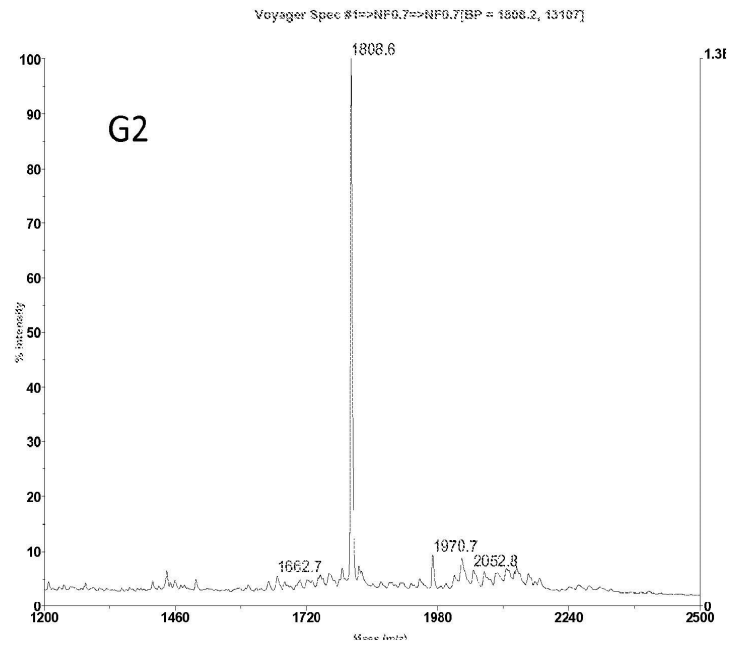


Fig. 3C

