



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 30 315 T2** 2006.02.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 994 903 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 30 315.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/13066**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 931 522.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/058964**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.06.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **30.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **25.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 16/00 (2006.01)**  
**A61K 39/395 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**881301 24.06.1997 US**

(73) Patentinhaber:  
**Genentech Inc., San Francisco, Calif., US**

(74) Vertreter:  
**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**RAJU, Shantha, T., San Mateo, US**

(54) Bezeichnung: **GALACTOSYLIERTE GLYKOPROTEINE ENTHALTENDE ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR DEREN HERSTELLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Hintergrund der Erfindung

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft Glykoprotein-Glykoformen sowie neue Zusammensetzungen, die die Glykoprotein-Glykoform-Präparate der Erfindung umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Glykoproteinzusammensetzungen, die Glykoproteine wie beispielsweise ein Immunglobulin, Antikörper oder Immunoadhäsine, die eine Immunglobulin-CH2-Domäne aufweisen und einen bestimmten N-gebundenen Glycan enthalten, umfassen. Die Erfindung betrifft weiters Verfahren zur Herstellung, Detektion, Anreicherung und Reinigung der Glykoprotein-Glykoform. Die Erfindung betrifft weiters pharmazeutische Zusammensetzungen, Verfahren zur Verwendung der Glykoform-Zusammensetzungen sowie Herstellungsartikel, die die Glykoformpräparate umfassen.

## Beschreibung verwandter Offenbarungen

**[0002]** Unterschiede in Glykosylierungsmustern rekombinant produzierter Glykoproteine erweckten erst jüngst großes Interesse in der wissenschaftliche Gemeinschaft, da rekombinante Proteine im Bereich klinischer Anwendungen in möglichen prophylaktischen und therapeutischen Ansätzen eingesetzt werden können. Antikörper oder Immunglobuline (Ig) sind Glykoproteine, die für die humorale Immunantwort eine zentrale Rolle spielen. Antikörper und Antikörper-ähnliche Moleküle wie beispielsweise Immunoadhäsine (US-Patent Nr. 5.116.964 und 5.565.335) wurden für klinische Verwendungszwecke bereits hergestellt, z.B. TNFR-IgG (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10535-1053 (1991), US-Patent Nr. 5.610.297 und "Ro45-2081" (TNFR55-IgG1) in: "Treatment of Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: Preliminary Results", Abraham et al., in: Sec. Intern. Autumnal Them. Meeting on Sepsis, Deauville, Frankreich (1995)); Anti-IL-8 (St John et al., Chest 103, 932 (1993), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/23865); Anti-CD11a (Fischer et al., Blood 77, 249-256 (1991); Stoppa et al., Transplant Intl. 4, 3-7 (1991); und Hourmant et al., Transplantation 58, 377-380 (1994)); Anti-IgE (Presta et al., J. Immunol. 151, 2623-2632 (1993), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/19181); Anti-HER2 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289(1992), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 92/20798); Anti-VEGF (Jin Kim et al., Growth Factors 7, 53-64 (1992), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 96/30046); und Anti-CD20 (Maloney et al., Blood 84, 2457-2466 (1994), Liu et al., J. Immunol. 139, 3521-3526 (1987)).

**[0003]** Alle Antikörper werden an konservierten Positionen in ihren konstanten Regionen glykosyliert (Jefferis & Lund, Chem. Immunol. 65, 111-128 (1997); Wright & Morrison, TibTECH 15, 26-32 (1997)). Die Oligosaccharidketten der Immunglobuline beeinflussen die Funktion des Proteins (Boyd et al., Mol. Immunol. 32, 1311-1318 (1995); A. Wittwer & S.C. Howard, Biochem. 29, 4175-4180 (1990)) und die intramolekulare Wechselwirkung zwischen Abschnitten des Glykoproteins, was zur Konformation und Darstellung dreidimensionaler Oberflächen des Glykoproteins führt (Jefferis & Lund, s.o.; Wyss & Wagner, Curr. Ops. Biotech. 7, 409-416 (1996); Hart, Curr. Op. Cell Biol. 4, 1017-1023 (1992); Goochee et al., Bio/Technology 9, 1347-1355 (1991); R. B. Parekh, Curr. Op. Struct. Biol. 1, 750-754 (1991)). Oligosaccharide können auch dazu dienen, ein beliebiges Glykoprotein auf bestimmte Strukturen, die auf spezifischen Erkennungsstrukturen aufbauen, zu richten. Beispielsweise wurde berichtet, dass in einem galactosyliertem IgG die Oligosaccharid-Gruppierung aus dem Zwischen-CH2-Raum "hinausschnellt" und terminale N-Acetylglucosaminreste zugänglich werden, um Mannose-Bindungsprotein zu binden (Malhotra et al., Nat. Med. 1, 237-243 (1995)). Auch wurde berichtet, dass die Gegenwart von nicht reduzierenden, terminalen Galactoseresten in Antikörper-CH2-Domänen für die Bindung von IgG an C1q- und Fc-Rezeptoren wichtig sein kann (Tsuchiya et al., J. Rheum. 16, 285-290 (1989)).

**[0004]** Da der für die Expression rekombinanter Glykoproteine als potentielle menschliche Therapeutika verwendete Zelltyp selten die native Zelle ist, kann mit signifikanten Variationen der Glykosylierungsmuster der Glykoproteine gerechnet werden. Gewebe-Plasminogenaktivator, der in verschiedenen Zelltypen produziert wird, resultiert in heterolog glykosylierten Molekülen (Parekh et al., Biochemistry 28, 7644-7662 (1989)). Dasselbe gilt für Immunglobuline (T. A. Hsu et al., J. Biol. Chem. 272, 9062-9070 (1997)).

**[0005]** Große Aufmerksamkeit wurde auf die Faktoren gerichtet, die Glykosylierung während rekombinanter Proteinproduktion beeinflussen, wie beispielsweise Wachstumsmodus (anhaftend oder in Suspension), Mediumformulierung, Kulturdichte, Sauerstoffanreicherung, pH, Reinigungsschemata und dergleichen (R. Werner und W. Noe, Drug Res. 43, 1134-1139 (1993); R. Werner und W. Noe, Drug Res. 43, 1242-1249 (1993); Hayter

et al., *Biotech. and Bioeng.* 39, 327-335 (1992); Borys et al., *Biotech. and Bioeng.* 43, 505-514 (1994); Borys et al., *Bio/technology* 11, 270-724 (1993); Hearing et al., *J. Cell Biol.* 108, 339-353 (1989); Goochee et al., in: *Frontiers in Bioprocessing II*, Todd et al. (Hrsg.), American Chemical Society, 199-240 (1992); US-Patent Nr. 5.096.816; W. Chotigeat, *Cytotech.* 15, 217-221 (1994)). Mehrere Gruppen untersuchten die Verfahrensparameter, die den Hintergrund für die Produktion rekombinanter Proteine darstellen, und insbesondere die Wirkung der Mediumszusammensetzung auf die Produktion rekombinanter Proteine (Park et al., *Biotech. Bioeng.* 40, 686-696 (1992); Cox & McClure, *In Vitro* 19, 1-6 (1983); Mizutani et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187, 664-669 (1992); Le Gros et al., *Lymph. Res.* 4(3), 221-227 (1985)). Verschiedene Verfahren wurden erwogen, um das Glykosylierungsmuster, das in einem bestimmten Wirtsorganismus erhalten wird, zu verändern, einschließlich das Einführen oder Überexprimieren bestimmter Enzyme, die in Oligosaccharidproduktion eingebunden sind (US-Patent Nr. 5.047.355, US-Patent Nr. 5.510.261). Diese Schemata sind nicht auf intrazelluläre Verfahren beschränkt (US-Patent Nr. 5.278.299).

**[0006]** CAMPATH-1H ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper, der das CDw52-Antigen menschlicher Lymphozyten erkennt (Sheeley et al., *Analytical Biochem.* 247, 102-110 (1997)). Das Entfernen der vollständigen intakten Oligosaccharidstruktur aus dem CAMPATH-1H, der in Chinahamster-Eierstock(CHO-) Zellen produziert wird, unter Verwendung von Glykopeptidase-F, führte zu einer völligen Reduktion von Komplement-vermittelter Zellyse ("complementmediated cell lysis", CMCL) (Boyd et al., *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318 (1996)), während selektives Entfernen von Sialsäureresten unter Verwendung von Neuraminidase zu keinem Verlust von CMCL führte. Für CAMPATH-1H, der mit  $\beta$ -Galactosidase behandelt wurde, von der erwartet wird, dass sie terminale Galactosylreste entfernt, wurde erkannt, dass er CMCL um weniger als die Hälfte reduzierte (Boyd et al., s.o.).

**[0007]** Während mehrere Arbeiten durchgeführt wurden, um die Struktur der N-gebundenen Glycane zu bewerten, die an die Schwereketten klinisch relevanter Antikörper gebunden sind, weisen diese Studien darauf hin, dass verschiedene Wirtszellen zu differenzieller N-Glycan-Verarbeitung in der Lage sind, und Analysen des produzierten Glykoproteins zeigen heterogene Glykoformen auf (Wormald et al., *Biochemistry* 36, 1370-1380 (1997)). Glykosylierungsdifferenzen in Antikörpern sind im Allgemeinen auf die konstante Domäne eingeschränkt und können die Struktur der Antikörper beeinflussen (Weitzhandler et al., *J. Pharm. Sci.* 83, 1670-1675 (1994)). Es ist daher wichtig, sicherzustellen, dass das Glykosylierungsmuster von Glykoproteinprodukten, die zu klinischen Verwendungszwecken produziert werden, durchwegs und unter den verschiedenen Produktionschargen gleichförmig ist, aber auch, dass die günstigen In-vivo-Eigenschaften der Antikörper zumindest beibehalten werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0008]** Die vorliegende Erfindung stellt ein im Wesentlichen homogenes und reproduzierbares Glykoproteinpräparat bereit, worin im Wesentlichen alle der Glykoproteinmoleküle des Präparats als eine bestimmte Glykoform existieren, wie in den beiliegenden Ansprüchen definiert ist. Die Erfindung sorgt dafür, dass unter bestimmten Bedingungen neue, im Wesentlichen homogene Glykoformpräparate erhalten werden können, die die erwünschten Eigenschaften von verlängerter Clearance aus dem Blut aufweisen und gleichzeitig ihre funktionelle Aktivität beibehalten oder verbesserte funktionelle Aktivität besitzen. Eine lange funktionelle Halbwertszeit ermöglicht vereinfachte Verabreichung in Dosierungen in Form eines Bolus und trägt zu In-vivo-Potenz des produzierten Glykoproteins bei, was Formen geringerer Dosierungen an Glykoprotein ermöglicht.

**[0009]** In einem bestimmten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung neue Glykoformpräparate für Glykoprotein-Pharmazeutika, Arzneimittel oder Medikamente bereit, worin das Glykoprotein eine Immunglobulin-CH2-Domäne mit einer im Wesentlichen gleichförmigen Glykoform umfasst. Es ist eine Eigenschaft der vorliegenden Erfindung, dass die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die neuen Glykoformpräparate umfassen, in bevorzugten Ausführungsformen bei Verabreichung an Tiere einschließlich Menschen vorteilhafterweise äußerst gute In-vivo-Eigenschaften aufweisen. Somit können die neuen Glykoform-Zusammensetzungen in all jenen Bereichen verwendet werden, in denen der verwandte pharmazeutische Glykoprotein-Wirkstoff verwendet wird, und liefert vorteilhafterweise verbesserte Eigenschaften sowie gesteigerte Gleichförmigkeit zwischen und innerhalb von Produktionschargen. Die Präparate der Erfindung können in Lösungen, Einheitsdosen-Formen wie Tabletten und Kapseln zur oralen Verabreichung sowie in Suspensionen, Salben und dergleichen eingebunden werden, was vom jeweiligen Wirkstoff oder Medikament und seinen Zielbereichen abhängt.

**[0010]** Gemäß einem bestimmten Aspekt der Erfindung werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die ein Glykoprotein umfassen, das eine Immunglobulin-CH2-Domäne umfasst, worin die CH2-Domäne zumindest

ein N-gebundenes Oligosaccharid aufweist und worin im Wesentlichen das gesamte Oligosaccharid ein G2-Oligosaccharid wie hierin definiert ist. Die Zusammensetzung ist im Wesentlichen frei von Glykoproteinen, die eine Immunglobulin-CH2-Domäne umfassen, worin das N-gebundene Oligosaccharid ein G1- oder G0-Saccharid ist. In bevorzugten Aspekten ist das Glykoprotein ein Antikörper und insbesondere ein monoklonaler Antikörper.

**[0011]** Die Erfindung stellt weiters ein Verfahren zur Herstellung der Präparate der Erfindung bereit, das die Schritte des Umsetzens:

- a) eines Metallsalzes in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 25 mM;
- b) einer aktivierten Galactose in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 50 mM;
- c) einer Galactosyltransferase in einer Konzentration von etwa 1 mU/ml bis etwa 100 mU/ml;
- d) eines Substrat-Glykoproteins;

in einer wässrigen gepufferten Lösung bei einer Temperatur von etwa 25-40 °C und des Gewinnens des Glykoproteins umfasst.

**[0012]** Die Erfindung umfasst pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Glykoformpräparate der Erfindung beinhalten. Die Zusammensetzungen sind vorzugsweise steril. Ist die Zusammensetzung eine wässrige Lösung, so ist das Glykoprotein vorzugsweise löslich. Ist die Zusammensetzung ein lyophilisiertes Pulver, so ist das Pulver vorzugsweise in einem geeigneten Lösungsmittel wieder herstellbar.

**[0013]** In wiederum einem anderen Aspekt bindet die Erfindung die obigen Präparate zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Erkrankungszustandes ein, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis der pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung an ein Säugetier, das dieser Behandlung bedarf, umfasst.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0014]** **Fig. 1A** und **Fig. 1B** zeigen Oligosaccharid-Analyse eines monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers C2B8 durch Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion. In **Fig. 1A** ist ersichtlich, dass C2B8, das in Chargen-befüllter 400-I-Kultur produziert wurde, zumindest drei Glykoformen von C2B8 enthielt. **Fig. 1B** zeigt dasselbe C2B8-Präparat, das mit  $\beta$ -1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt wurde. Ein einzelnes G2-Glykoformpräparat wurde erhalten.

**[0015]** **Fig. 2** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpers durch Kapillarelektrophorese. Es ist ersichtlich, dass Anti-VEGF, das in CHO-Zellkultur produziert wurde, zumindest drei Glykoformen produzierte. Derselbe Anti-VEGF, behandelt mit  $\beta$ -1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung, produzierte eine einzelne G2-Glykoform.

**[0016]** **Fig. 3** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers durch Kapillarelektrophorese. Es ist ersichtlich, dass das Anti-IgE, das in CHO-Zellkultur produziert wurde, zumindest drei Glykoformen enthielt. Dieselbe Anti-IgE-CHO-Zellzusammensetzung, die mit  $\beta$ -1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt war, produzierte eine einzelne G2-Glykoform.

**[0017]** **Fig. 4** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-HER2-Antikörpers durch Kapillarelektrophorese. Es ist ersichtlich, dass das Anti-HER2, produziert in CHO-Zellkultur, zumindest drei Glykoformen enthielt, die eine heterologe Oligosaccharid-Population bildeten. Dieselbe Anti-HER2-CHO-Zusammensetzung, behandelt mit  $\beta$ -1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung, produzierte eine einzelne G2-Glykoform.

**[0018]** **Fig. 5** zeigt eine repräsentative SDS-Polyacrylamid-Gelanalyse eines monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Bahn 1 sind Molekulargewichtsstandards, Bahn 2 ist die G2-Glykoform von C2B8; Bahn 3 ist das C2B8-Präparat, behandelt mit Galactosidase, um Galactosereste von den Oligosacchariden zu entfernen; Bahn 4 ist das von CHO abgeleitete C2B8-Präparat, behandelt mit PNGase-F zur Entfernung von intaktem Oligosaccharid; Bahn 5 ist der C2B8-Antikörper aus CHO-Produktion; Bahn 6 ist das von CHO abgeleitete C2B8 nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C; Bahn 7 ist das von CHO abgeleitete C2B8 und BSA. Das repräsentative Gel zeigt, dass die Integrität des C2B8-Moleküls nach Behandlung mit der Galactosyltransferase intakt bleibt. Die G2-Glykoform schließt die Primärstruktur des Antikörpers nicht auf.

**[0019]** **Fig. 6** zeigt dasselbe Material, das zuvor beschrieben wurde, analysiert mittels Polyacrylamid-Gele-

lektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Die C2B8-Schwer- und -Leichtketten verbleiben intakt.

[0020] [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) zeigen Fern- und Nah-UV-Zirkulardichroismus- (-CD-) Spektren von C2B8-Antikörper aus CHO-Kultur und der G2-Glykoform. Die zwei Präparate haben praktisch identische CD-Spektren, was darauf hinweist, dass der Antikörper dieselbe Sekundärstruktur aufweist (Provencher & Glockner, Biochem. 20, 33-37 (1981)).

[0021] [Fig. 8](#) zeigt die Bioaktivität des G2-Glykoformpräparats im Vergleich zur heterogenen Zusammensetzung für C2B8 in einem Kaninchenkomplement-Lysetest.

[0022] [Fig. 9](#) zeigt die Korrelation von Bioaktivität und Galactosegehalt in der G2-Glykoform. Das Glykoformpräparat war zumindest 1,5-mal aktiver in diesem Test als jenes, das unter typischen Zellkulturbedingungen hergestellt wurde.

#### Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

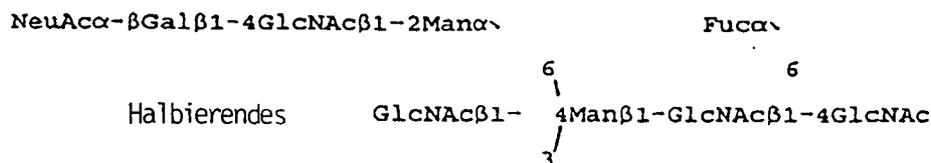
##### Definitionen

[0023] Die Kohlenhydratgruppierungen der vorliegenden Erfindung werden unter Verweis auf üblicherweise verwendete Nomenklatur für die Beschreibung von Oligosacchariden beschrieben. Ein Überblick über Kohlenhydratchemie, der diese Nomenklatur verwendet, ist in Hubbard & Ivatt, Ann. Rev. Biochem. 50, 555-583 (1981), zu finden. Diese Nomenklatur umfasst beispielsweise Man, das für Mannose steht; GlcNAc, das für 2-N-Acetylglucosamin steht; Gal, das für Galactose steht; Fuc für Fucose; und Glc, das für Glucose steht. Sialsäuren werden unter Verweis auf die Abkürzungen NeuNAc für 5-N-Acetylneuraminsäure und NeuNGc für 5-Glykolyneuraminsäure beschrieben (J. Biol. Chem. 257, 3347 (1982); J. Biol. Chem. 257, 3352 (1982)).

[0024] Die Kohlenhydratstrukturen der vorliegenden Erfindung treten am Protein auf, das als N-gebundene Oligosaccharide exprimiert wird. "N-gebundene Glykosylierung" bezieht sich auf die Anbindung der Kohlenhydratgruppierung über GlcNAc an einen Asparaginrest in einer Polypeptidkette. Die N-gebundenen Kohlenhydrate enthalten alle eine gemeinsame Man1-6(Man1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -R-Kernstruktur. Daher stellt in der beschriebenen Kernstruktur R einen Asparaginrest des produzierten Glykoproteins dar. Die Sequenz des produzierten Proteins enthält ein Asparagin-X-Serin, Asparagin-X-Threonin und Asparagin-X-Cystein, worin X jede beliebige Aminosäure außer Prolin ist. O-gebundene Kohlenhydrate sind im Gegensatz dazu durch eine gemeinsame Kernstruktur charakterisiert, die in einer GalNAc besteht, die an die Hydroxylgruppe eines Threonins oder Serins gebunden ist. Von den N-gebundenen Kohlenhydraten sind die wichtigsten die "komplexen" N-gebundenen Kohlenhydrate. Gemäß der vorliegenden Erfindung sind solche komplexen Kohlenhydrate aus den hierin beschriebenen "doppelfühlerartigen" Strukturen ausgewählt.

[0025] Fachleute werden erkennen, dass das Glykoprotein-Immunglobulin (IgG) mit drei Typen von komplexen doppelfühlerartigen Strukturen assoziiert ist, die keinen, einen oder zwei Galactose-Rest(e) enthalten (Wormland et al., Biochemistry 36, 1370-1380 (1997)), die üblicherweise als G0, G1 bzw. G2 bekannt sind. Bezüglich menschlicher Antikörpermoleküle der IgG-Klasse ist anzumerken, dass jedes ein N-gebundenes Oligosaccharid aufweist, das an die Amid-Seitenkette von Asn 297 der  $\beta$ -4-Krümmung der Innenfläche der CH2-Domäne der Fc-Region gebunden ist (Beale & Feinstein, Q. Rev. Biophys. 9, 253-259 (1976); Jefferis et al., Immunol. Letts. 44, 111-117 (1995)). Die Oligosaccharid-Gruppierung, die an Asn 297 der IgG-CH2-Domäne gebunden ist, ist vom komplexen doppelfühlerartigen Typ mit der identifizierten Hexasaccharid-Kernstruktur und variablen äußeren Zuckerresten (siehe Jefferis et al., s.o. (1997); Wyss & Wagner, Current Opinions in Biotech. 7, 409-416 (1996)). Die Kernstruktur (GlcNAc2Man3GlcNAc) ist typisch für doppelfühlerartige Oligosaccharide und kann schematisch wie folgt dargestellt werden:

1,6-Ann



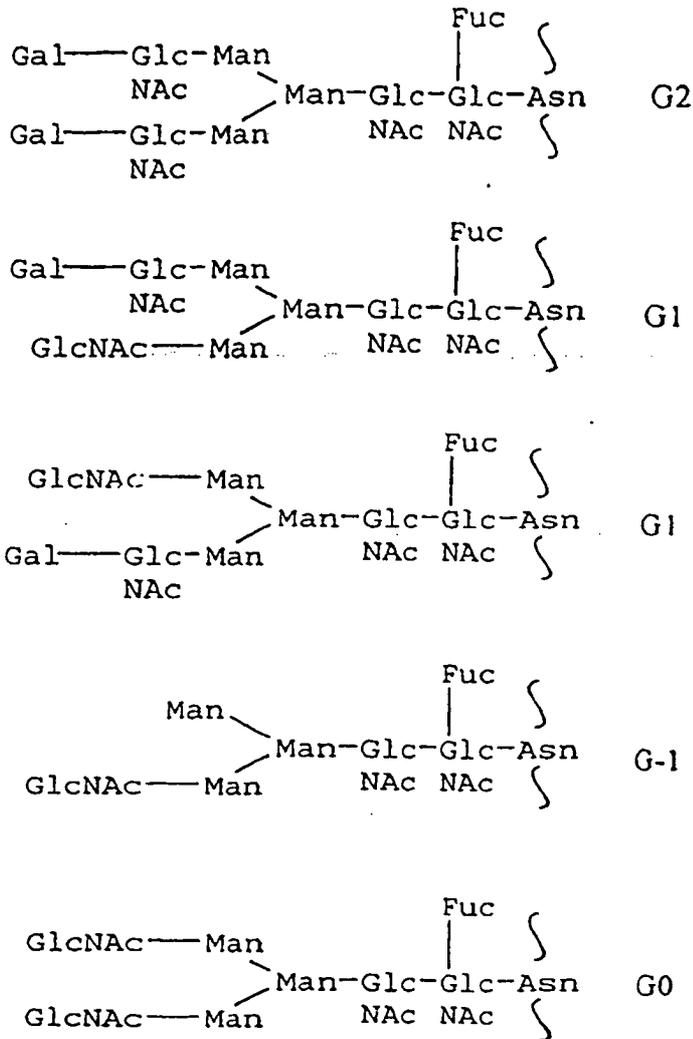
NeuAc $\alpha$ - $\beta$ Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$

1,3-Ann

[0026] Da jede Kernstruktur ein halbierendes N-Acetylglucosamin, Kernfucose und entweder Galactose- oder

Sialsäure-Außensaccharide aufweist, gibt es eine Gesamtzahl von 36 strukturell einmaligen Oligosacchariden, die die Asn-297-Stelle besetzen können (Jefferis & Lund, s.o.). Es wird ebenso anerkannt, dass innerhalb einer bestimmten CH2-Domäne Glykosylierung an Asn 297 aufgrund von verschiedenen Oligosaccharidketten, die an jeden Asn-297-Rest innerhalb der Zwei-Ketten-Fc-Domäne gebunden sind, asymmetrisch erfolgen kann. Während beispielsweise die synthetisierte Schwereketten innerhalb einer einzelnen Antikörper-sekretierenden Zelle in ihrer Aminosäuresequenz homogen sein kann, wird sie im Allgemeinen unterschiedlich glykosyliert, was zu einer großen Anzahl an strukturell einmaligen Ig-Glykoformen führt.

**[0027]** Die Haupttypen komplexer Oligosaccharidstrukturen, die in der CH2-Domäne des IgG zu finden sind, sind nachstehend dargestellt.



**[0028]** Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich G0 auf eine doppelfühlerartige Struktur, worin keine terminalen Sialsäuren (NeuAcs) oder Gals vorhanden sind, G1 bezieht sich auf eine doppelfühlerartige Struktur mit einer Gal und keinen NeuAcs, und G2 bezieht sich auf eine doppelfühlerartige Struktur mit zwei terminalen Gals und keinen NeuAcs.

**[0029]** Alle Immunglobuline können als Glykoproteine mit einer gemeinsamen Grundstruktureinheit aus zwei Leichtkettenpolypeptiden und zwei Schwerekettenpolypeptiden beschrieben werden, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, die für Thiol-reduzierende Mittel in wässrigem Puffer zugänglich sind. Leichtketten treten in Form zwei, verschiedener Typen auf,  $\kappa$  oder  $\lambda$ , und sind in allen Immunglobulinen gleich. Schwereketten unterscheiden sich von einem Immunglobulin zum anderen und bestimmen die Klasse und Unterklasse des Immunglobulins. Antikörper (und Immunglobuline) sind im Allgemeinen heterotetramere Glykoproteine mit etwa 150.000 Da, zusammengesetzt aus zwei identischen Leicht- (L-) Ketten und zwei identischen Schwere- (H-) Ketten. Jede Leichtkette ist durch eine kovalente Disulfidbindung an eine Schwerekette gebunden, während die Anzahl an Disulfidbindungen zwischen den Schwereketten von unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen variiert. Jede Schwere- und Leichtkette weist auch regelmäßig beabstandete Zwischenketten-Disulfidbrücken auf. Jede Schwerekette hat eine Amino-terminale variable Domäne (VH), gefolgt von Carboxy-terminalen kon-

stanten Domänen. Jede Leichtkette weist eine variable N-terminale Domäne (VL) und eine C-terminale konstante Domäne auf; die konstante Domäne der Leichtkette ist mit der ersten konstanten Domäne der Schwereketten abgeglichen, und die variable Leichtketten-Domäne ist mit der variablen Domäne der Schwereketten abgeglichen. Von bestimmten Aminosäureresten wird angenommen, dass sie eine Grenzfläche zwischen den variablen Leicht- und Schwereketten-Domänen bilden (Clothia et al., J. Mol. Biol. 186, 651 (1985); Novotny & Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4592 (1985)). Je nach Aminosäuresequenz der konstanten (C-) Domäne der Schwereketten können Immunglobuline verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt vier Hauptklassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die konstanten Schwereketten-Domänen, die den verschiedenen Klassen von Immunglobulinen entsprechen, werden als  $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\gamma$ - bzw.  $\mu$ -Domänen bezeichnet. Die Immunglobulinklassen können weiter in Unterklassen (Isotypen) unterteilt werden, z.B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>.

**[0030]** Die Untereinheit-Strukturen und dreidimensionalen Strukturen verschiedener Klassen von Immunglobulinen sind bekannt. Von diesen sind IgA und IgM polymer, und jede Untereinheit enthält zwei Leicht- und zwei Schwereketten. Gemäß der Domänenhypothese von Immunglobulin-Polypeptidketten weisen Leicht- (L-) Ketten zwei konformationsähnliche variable Domänen VL und CL und Schwereketten vier Domänen (VH, CH1, CH2 und CH3), von denen jede eine Intraketten-Disulfidbrücke besitzt, auf. Sequenzstudien zeigten, dass die  $\mu$ -Kette von IgM fünf Domänen, VH, CH $\mu$ 1, CH $\mu$ 2, CH $\mu$ 3 und CH $\mu$ 4, enthält. Die Schwereketten von IgE ( $\epsilon$ ) enthält auch fünf Domänen, während die Schwereketten von IgA ( $\alpha$ ) vier Domänen aufweist.

**[0031]** Die Schwereketten von IgG ( $\gamma$ ) enthält eine Länge der Polypeptidkette, die zwischen den CH $\gamma$ 1- und CH $\gamma$ 2-Domänen liegt und als die Gelenksregion bekannt ist. Die  $\alpha$ -Kette weist eine Gelenksregion auf, die eine O-gebundene Glykosylierungsstelle enthält, und die  $\mu$ - und  $\epsilon$ -Ketten haben keine Sequenz, die analog zur Gelenksregion der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Ketten sind, wobei sie jedoch eine vierte konstante Domäne enthalten, die den anderen fehlt. Die Domänenzusammensetzung von Immunglobulinketten kann wie folgt zusammengefasst werden:  
Leichtkette  $\lambda = V\lambda C\lambda$

$\kappa = V\kappa C\kappa$

Schwereketten IgG ( $\gamma$ ) = VH CH $\gamma$ 1, Gelenk CH $\gamma$ 2 CH $\gamma$ 3

IgM ( $\mu$ ) = VH CH $\mu$ 1 CH $\mu$ 2 CH $\mu$ 3 CH $\mu$ 4

IgA ( $\alpha$ ) = VH CH $\alpha$ 1 Gelenk CH $\alpha$ 2 CH $\alpha$ 3

IgE ( $\epsilon$ ) = VH CH $\epsilon$ 1 CH $\epsilon$ 2 CH $\epsilon$ 3 CH $\epsilon$ 4

IgD ( $\delta$ ) = VH CH $\delta$ 1 Gelenk CH $\delta$ 2 CH $\delta$ 3

**[0032]** Die "CH2"-Domäne der vorliegenden Erfindung soll eine CH2 wie zuvor beschrieben beschreiben, die ein einzelnes, N-gebundenes Oligosaccharid wie für IgG-CH $\gamma$ 2-Domäne identifiziert aufweist. Es ist charakteristisch für das Glykoprotein der vorliegenden Erfindung, dass es zumindest eine CH2-Domäne mit einem N-gebundenen Oligosaccharid einer menschlichen IgG-CH2-Domäne enthält oder modifiziert wird; um sie zu enthalten. Die CH2-Domäne ist vorzugsweise die CH $\gamma$ 2-Domäne von menschlichem IgG<sub>1</sub>.

**[0033]** Die Bezeichnung "Glykoform", wie im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet, soll ein Glykoprotein bezeichnen, das eine bestimmte Kohlenhydratstruktur oder -strukturen enthält.

**[0034]** Die Phrasen "im Wesentlichen homogen", "im Wesentlichen gleichförmig" und "wesentliche Homogenität" bedeuten, dass die Menge von Nebenprodukten, die aus unerwünschten Glykoformen (z.B. G0 und G1) stammen, 10 % nicht übersteigt und vorzugsweise unter 5 %, noch bevorzugter unter 1 %, am meisten bevorzugt unter 0,5 %, liegt, worin diese Prozentsätze auf das Gewicht bezogen sind.

**[0035]** Das "CD20"-Antigen wird während früher Prä-B-Zell-Entwicklung exprimiert und kann einen Schritt bei der Zellaktivierung regulieren, der für Zellzyklusbeginn und -differenzierung erforderlich ist. Das CD20-Antigen wird in hohen Konzentrationen an neoplastischen B-Zellen exprimiert; dennoch ist es auch an normalen B-Zellen vorhanden. Anti-CD20-Antikörper, die das CD20-Oberflächenantigen erkennen, wurden klinisch verwendet, um zum Targeting und zur Zerstörung neoplastischer B-Zellen zu führen (Maloney et al., Blood 84, 2457-2466 (1994); Press et al., NEJM 329, 1219-1224 (1993); Kaminski et al., NEJM 329, 459-465 (1993); McLaughlin et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 15, 417 (1996)). Chimäre und humanisierte Anti-CD20-Antikörper vermitteln komplementabhängige Lyse von Target-B-Zellen (Maloney et al., s.o.). Der monoklonale Antikörper C2B8 erkennt das menschliche B-Zelleingeschränkte Differenzierungs-Antigen Bp35 (Liu et al., J. Immunol. 139, 3521 (1987); Maloney et al., Blood 84, 2457 (1994)). "C2B8" ist als der monoklonale Anti-CD20-Antikörper definiert, der in der Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 94/11026 beschrieben ist.

**[0036]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Bezeichnung "Glykoprotein" verwendet, um ein Polypep-

tid zu beschreiben, das zumindest eine Immunglobulin-Schwerkettenoder -"CH2"-Domäne mit zumindest einem komplexen, N-gebundenen, doppelfühlerartigen Oligosaccharid umfasst. Daher ist gemäß der vorliegenden Erfindung ein Glykoprotein, das eine "CH2"-Domäne umfasst, als eines zu verstehen, das zumindest die eine CH2-Domäne wie hierin definiert umfasst. Die Bezeichnung Glykoprotein bindet Antikörper (polyklonal und monoklonal), chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, chimäre Proteine, umfassend eine CH2-Domäne wie hierin definiert, wie beispielsweise chimäre und bispezifische Immunoadhäsine und andere chimäre Proteine, die eine CH2-Domäne umfassen, ein.

**[0037]** Die Bezeichnungen Antikörper und Immunglobuline werden synonym verwendet, um Glykoproteine zu bezeichnen, die die zuvor für Antikörper genannten strukturellen Eigenschaften aufweisen.

**[0038]** Die Bezeichnung "Antikörper" wird im weitesten Sinn verwendet und deckt spezifisch einzelne monoklonale Antikörper (einschließlich Agonisten- und Antagonisten-Antikörper) und Antikörperzusammensetzungen mit polyepitoper Spezifität ab. Die Bezeichnung "Antikörper" deckt spezifisch monoklonale Antikörper (einschließlich monoklonaler Vollängen-Antikörper), polyklonale Antikörper, multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper) und Antikörperfragmente ab, solange diese zumindest den Abschnitt der CH2-Domäne der konstanten Schwerketten-Immunglobulinregion, die die einzelne N-gebundene Glykosylierungsstelle umfasst, enthalten oder modifiziert werden, um ihn zu enthalten. Beispiele für Antikörper, die im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung liegen, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Anti-IL-8, St. John et al., Chest 103, 932 (1993), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/23865; Anti-CD11a, Filcher et al., Blood 77, 249-256, Steppe et al., Transplant Intl. 4, 3-7 (1991), und Hourmant et al., Transplantation 58, 377-380 (1994); Anti-IgE, Presta et al., J. Immunol. 151, 2623-2632 (1993), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/19181; Anti-HER2, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289 (1992), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 92/20798; Anti-VEGF, Jin Kim et al., Growth Factors 7, 53-64 (1992), und Internationale Veröffentlichung Nr. WO 96/30046; und Anti-CD20, Maloney et al., Blood 84, 2457-2466 (1994), und Liu et al., J. Immunol. 139, 3521-3526 (1987).

**[0039]** Die Bezeichnung "Präparat" wie hierin verwendet definiert eine Zusammensetzung, die als Komponente identifiziert und getrennt und/oder aus ihrer Umgebung gewonnen wurde. Kontaminanten-Komponenten aus ihrer Umgebung sind Materialien, die diagnostische oder therapeutische Verwendungen für den Antikörper stören würden, wie beispielsweise unerwünschte oder nicht beabsichtigte Glykoformen (G0 und G1), und können Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige oder nicht-proteinhaltige Gelöststoffe umfassen. Das Präparat der Erfindung weist keine solcher Kontaminanten auf. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Antikörperpräparat (1) zu mehr als 95 Gew.-% des Antikörper, wie durch das Lowry-Verfahren bestimmt, und am meisten bevorzugt mehr als 99 Gew.-%, (2) zu einem ausreichenden Grad, um zumindest 15 Reste von N-terminaler oder innerer Aminosäuresequenz zu erhalten, mittels eines Zentrifugenröhrchen-Sequenzierers oder (3) bis zur Homogenität durch SDS-PAGE unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen unter Verwendung von Coomassie-Blau- oder vorzugsweise Silberfärbung gereinigt.

**[0040]** Die Bezeichnung "monoklonaler Antikörper" (mAb) wie hierin verwendet bezieht sich auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten wird; d.h. dass die einzelnen Antikörper; die eine Population umfasst, unter Ausnahme möglicher, natürlich vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sind, identisch sind. Monoklonale Antikörper sind hochspezifisch und werden gegen eine einzelne antigene Stelle gerichtet. Weiters wird im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörperpräparaten, die typischerweise verschiedene Antikörper einbinden, die gegen unterschiedliche Determinanten (Epitope) gerichtet sind, jeder mAb gegen eine einzelne Determinante am Antigen gerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität haben die monoklonalen Antikörper den Vorteil, dass sie durch Hybridomkultur synthetisiert werden können, unkontaminiert durch andere Immunglobuline. Der Modifikator "monoklonal" weist auf die Eigenschaft des Antikörpers hin, dass er aus einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern erhalten wird, und ist nicht als die Notwendigkeit zu verstehen, den Antikörper mittels eines bestimmten Verfahrens herzustellen. Beispielsweise können die monoklonalen Antikörper, die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwenden sind; durch das Hybridomverfahren, das als erstes von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), beschrieben wurde, oder durch DNA-Rekombinationsverfahren (siehe z.B. das US-Patent Nr. 4.816.567, das an Cabilly et al. erteilt wurde) hergestellt werden. Die "monoklonalen Antikörper" umfassen auch Klone von Antigen-Erkennungs- und -Bindungsstellen, die Antikörperfragmente (Fv-Klone) enthalten, die aus Phagen-Antikörperbibliotheken unter Verwendung der in Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beispielsweise beschriebenen Verfahren isoliert wurden.

**[0041]** Die monoklonalen Antikörper hierin binden hybride und rekombinante Antikörper ein, die durch Spleißen einer variablen (einschließlich hypervariablen) Domäne eines Antikörpers mit einer konstanten Domäne

(z.B. "humanisierte" Antikörper) oder einer Leichtkette mit einer Schwerekettenkette oder einer Kette aus einer Spezies mit einer Kette einer anderen Spezies oder durch Fusionen mit heterologen Proteinen, unabhängig von der Ausgangsspezies oder der Immunglobulinklassen- oder -unterklassenbezeichnung, hergestellt werden. (Siehe z.B. US-Patent Nr. 4.816.567, das an Cabilly et al. erteilt wurde; Mage & Lamoyi, in: *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 79-97, Marcel Dekker Inc., New York (1987)).

**[0042]** Die monoklonalen Antikörper hierin umfassen spezifisch "chimäre" Antikörper (Immunglobuline), in denen ein Abschnitt der schweren und/oder leichten Kette mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die aus einer bestimmten Spezies stammen oder einer bestimmten Antikörperklasse oder -unterklasse angehören, identisch oder homolog zu ihnen ist, während der Rest der Kette(n) mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die aus einer anderen Spezies stammen oder einer anderen Antikörperklasse oder -unterklasse angehören, identisch oder homolog zu ihnen ist, sowie Fragmente solcher Antikörper, sofern sie zumindest eine CH2-Domäne enthalten oder modifiziert werden, um sie zu enthalten (Cabilly et al., s.o.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851 (1984)).

**[0043]** "Humanisierte" Formen von nicht-menschlichen (z.B. Maus-) Antikörpern sind spezifische chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie beispielsweise Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> oder andere Antigen-bindende Subsequenzen von Antikörpern), die Minimalsequenzen enthalten, die aus nicht-menschlichem Immunglobulin stammen. Zum Großteil sind humanisierte Antikörper menschliche Immunglobuline (Akzeptorantikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Akzeptors durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Donorantikörper) wie beispielsweise Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt werden. In manchen Fällen werden Fv-Gerüstreste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Weiters können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die weder im Akzeptorantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Diese Modifikationen werden durchgeführt, um Antikörperleistung weiter zu verfeinern und zu maximieren. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle zumindest einer, und typischerweise zweier, variabler Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen, und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen sind jene einer menschlichen Immunglobulin-Consensus-Sequenz. Der humanisierte Antikörper umfasst optimalerweise auch zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins. Für nähere Details siehe Jones et al., *Nature* 321, 522 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332, 323 (1988); und Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 593 (1992).

**[0044]** Wie hierin verwendet bezeichnet "Immunoadhäsine" Antikörper-ähnliche Moleküle, die die "Bindungsdomäne" eines heterologen Proteins (eines "Adhäsins", z.B. eines Rezeptors, Liganden oder Enzyms) mit den Effektorfunktionen von konstanten Immunglobulin-domänen kombinieren. Strukturell betrachtet umfassen die Immunoadhäsine eine Fusion der Adhäsins-Aminosäuresequenz mit der erwünschten Bindungsspezifität, die sich von jener der Antigen-Erkennungs- und -Bindungsstelle (Antigen-Kombinationsstelle) eines Antikörpers unterscheidet (d.h. "heterolog" ist), und eine konstante Immunglobulin-Domänensequenz. Die konstante Immunglobulin-domänensequenz im Immunoadhäsine kann aus jedem beliebigen Immunglobulin, z.B. den IgG<sub>1</sub>-, IgG<sub>2</sub>-, IgG<sub>3</sub>- oder IgG<sub>4</sub>-Subtypen oder aus IgA, IgE, IgD oder IgM, erhalten werden. Immunoadhäsine werden beispielsweise im US-Patent Nr. 5.116.964 beschrieben.

**[0045]** Wie hierin verwendet bezeichnet die Phrase "multispezifisches Immunoadhäsine" Immunoadhäsine (wie hierin zuvor definiert) mit zumindest zwei Bindungsspezifitäten (d.h. eine Kombination von zwei oder mehr Adhäsins-Bindungsdomänen). Multispezifische Immunoadhäsine können als Heterodimere, Heterotrimere oder Heterotetramere angeordnet werden, die im Wesentlichen in der WO 89/02922 (veröffentlicht am 6. April 1989), in EP 314.317 (veröffentlicht am 3. Mai 1989) und im US-Patent Nr. 5.116.964 (ausgegeben am 2. Mai 1992) offenbart sind. Bevorzugte multispezifische Immunoadhäsine sind bispezifisch. Beispiele für bispezifische Immunoadhäsine umfassen CD4-IgG/TNF-Rezeptor-IgG und Cd4-IgG/L-Selectin-IgG. Das letztgenannte Molekül kombiniert die Lymphknoten-Bindungsfunktion des Lymphozyten-Homing-Rezeptors (LHR, L-Selectin) und die HIV-Bindungsfunktion von CD4 und findet potentielle Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Prävention oder Behandlung von HIV-Infektion, damit verbundenen Erkrankungen oder auch als Diagnostikum.

**[0046]** Eine "Antikörper-Immunoadhäsins-Chimäre" (Ab/Ia-Chimäre) umfasst ein Molekül, das zumindest eine Bindungsdomäne eines Antikörpers (wie hierin definiert) mit zumindest einem Immunoadhäsine (wie in dieser Anmeldung definiert) kombiniert. Beispiele für Ab/Ia-Chimären sind die bispezifischen CD4-IgG-Chimären, die von Berg et al., s.o., und Chamow et al., s.o., beschrieben werden. Immunoadhäsine umfassen CD4 (Capon

et al., Nature 337, 525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339, 68-70 (1989); und Byrn et al., Nature 344, 667-670 (1990)); L-Selectin oder Homing-Rezeptor (Watson et al., J. Cell. Biol. 110, 2221-2229 (1990)); und Watson et al., Nature 349, 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., Cell 61, 1303-1313 (1990)); CD28 und B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173, 721-730 (1991)); CTLA-4 (Linsley et al., J. Exp. Med. 174, 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66, 1133-1144); TNF-Rezeptor (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27, 2883-2886 (1991); und Peppel et al., J. Exp. Med. 174, 1483-1489 (1991)); NP-Rezeptoren (Bennett et al., J. Biol. Chem. 266, 23060-23067 (1991)); Interferon- $\gamma$ -Rezeptor (Kurschner et al., J. Biol. Chem. 267, 9354-9360 (1992)); 4-1BB (Chalupny et al., PNAS USA 89, 10360-10364 (1992)) und IgE-Rezeptor  $\alpha$  (Ridgway & Gorman, J. Cell. Biol. 115, Abstract Nr. 1448 (1991)).

**[0047]** Beispiele für homomultimere Immunoadhäsine, die zur therapeutischen Verwendung bereits beschrieben wurden, umfassen das CD4-IgG-Immunoadhäsine zum Blockieren der Bindung von HIV an Zelloberflächen-CD4. Daten, die aus klinischen Phase-I-Versuchen erhalten wurden, in denen schwangeren Frauen CD4-IgG kurz vor der Entbindung verabreicht wurden, lassen darauf schließen, dass dieses Immunoadhäsine zur Prävention von HIV-Übertragung von der Mutter auf den Fötus nützlich sein kann. Ashkenazi et al., Intern. Rev. Immunol. 10, 219-227 (1991). Ein Immunoadhäsine, das Tumornekrosefaktor (TNF) bindet, wurde auch bereits entwickelt. TNF ist ein entzündungsförderndes Cytokin, das sich als ein zentraler Vermittler von septischen Schocks erwiesen hat. Auf Grundlage eines Mausmodells von septischem Schock zeigte ein TNF-Rezeptorimmunoadhäsine gewisse Ansätze als ein Kandidat für klinische Verwendungszwecke bei der Behandlung septischer Schocks (A. Ashkenazi et al., PNAS USA 88, 10535-10539 (1991)).

**[0048]** Weisen die zwei Arme der Immunoadhäsinstruktur unterschiedliche Spezifitäten auf, so wird das Immunoadhäsine durch Analogie zu bispezifischen Antikörpern als ein "bispezifisches Immunoadhäsine" bezeichnet. Dietsch et al., J. Immunol. Methods 162, 123 (1993), beschreiben solch ein bispezifisches Immunoadhäsine, das die extrazellulären Domänen des Adhäsionsmoleküls, E-Selectin und P-Selectin, kombiniert, wobei die zwei Selectine in der Natur in einem unterschiedlichen Zelltyp exprimiert werden. Bindungsuntersuchungen wiesen darauf hin, dass das bispezifische Immunglobulin-Fusionsprotein, das so gebildet wurde, im Vergleich zu den monospezifischen Immunoadhäsinen, von denen es abgeleitet wurde, eine gesteigerte Fähigkeit aufwies, sich an eine Knochenmarkzelllinie zu binden.

**[0049]** Die Erfindung betrifft auch Immunkonjugate, die den hierin beschriebenen Antikörper umfassen, der an ein zytotoxisches Mittel wie beispielsweise einen chemotherapeutischen Wirkstoff, Toxin (z.B. ein enzymatisch aktives Toxin bakteriellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder von Pilzen abstammend, oder Fragmente davon) oder ein radioaktives Isotop konjugiert ist (d.h. ein Radiokonjugat).

**[0050]** In einer anderen Ausführungsform kann der Antikörper an einen "Rezeptor" (wie beispielsweise Streptavidin) zur Verwendung bei Tumor-Pretargeting konjugiert sein, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat dem Patienten verabreicht wird, woraufhin ungebundenes Konjugat unter Verwendung eines Klärungsmittels aus dem Blutkreislauf entfernt wird und dann ein "Ligand" (z.B. Avidin) verabreicht wird, der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionuclid) konjugiert ist.

**[0051]** "Behandlung" bezieht sich sowohl auf therapeutische Behandlung als auch auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen. Jene, die einer Behandlung bedürfen, umfassen jene, die bereits erkrankt sind, sowie jene, die dazu neigen, an dieser Erkrankung zu leiden, oder jene, bei denen es die Erkrankung zu vermeiden gilt.

**[0052]** Die Bezeichnungen "Behandeln", "Behandlung" und "Therapie" beziehen sich auf kurative Therapie, prophylaktische Therapie und präventive Therapie.

**[0053]** Die Bezeichnung "Säugetier" bezieht sich auf jedes Säugetier, das als Säugetier klassifiziert ist, einschließlich Menschen, Kühe, Pferde, Hunde und Katzen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Säugetier ein Mensch.

**[0054]** Wie hierin verwendet sind Protein, Peptid und Polypeptid untereinander austauschbar zu verwenden, um ein Aminosäurepolymer oder eine Reihe von zwei oder mehreren wechselwirkenden oder gebundenen Aminosäurepolymeren zu bezeichnen.

**[0055]** Die Bezeichnung "Erkrankungszustand" bezieht sich auf einen physiologischen Zustand einer Zelle oder eines ganzen Säugetiers, in der/dem eine Unterbrechung, ein Aussetzen oder eine Störung von Zell- oder Körperfunktionssystemen oder Organen aufgetreten ist.

**[0056]** Die Bezeichnung "Krebs" und "kanzerös" beziehen sich auf oder beschreiben das physiologische Leiden bei Säugetieren, das typischerweise durch unreguliertes Zellwachstum charakterisiert ist. Beispiele für Krebs umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Karzinom, Lymphom, Blastom, Sarkom und Leukämie. Spezifischere Beispiele für solche Krebsarten umfassen Schuppenzellkrebs, kleinzelligen Lungenkrebs, nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, Magenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gliazellentumoren wie beispielsweise Glioblastom und Neurofibromatose, Gebärmutterhalskrebs, Ovarialkrebs, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, Brustkrebs, Dickdarmkrebs, Kolorektalkrebs, Endometriumkarzinom, Speicheldrüsenkarzinom, Nierenkrebs, renalen Krebs, Prostatakrebs, Vulvakarzinom, Schilddrüsenkrebs, Leberkarzinom und verschiedene Arten von Kopf- und Halskrebs.

**[0057]** Die Bezeichnung "Entzündungserkrankung" bezieht sich auf einen grundlegenden pathologischen Vorgang, der aus einem dynamischen Komplex zytologischer und histologischer Reaktionen besteht, die in den betroffenen Blutgefäßen und benachbarten Geweben als Reaktion auf eine Verletzung oder eine abnormale Stimulierung, die durch ein physikalisches, chemisches oder biologisches Mittel verursacht wird, auftreten, einschließlich: 1) der örtlichen Reaktionen und resultierenden morphologischen Veränderungen, 2) der Zerstörung oder Entfernung des verletzten Materials, 3) der Reaktionen, die zur Reparatur und Heilung führen. Entzündungserkrankungen, die durch die Erfindung behandelt werden können, sind jene, in denen die Entzündung mit Cytokin-induzierten Erkrankungen assoziiert ist, wie beispielsweise jenen, die mit Interleukin- und Leukämie-Inhibitionsfaktor-Cytokinen assoziiert sind. Solche Erkrankungen umfassen Anomalien der Thrombopoese, Makrophagenwachstum und -differenzierung, Proliferation von blutbildenden Vorläufern und dergleichen.

**[0058]** Die Bezeichnung "neurologische Erkrankung" bezieht sich auf oder beschreibt das physiologische Leiden bei Säugetieren, das typischerweise durch Nervenzellwachstum, Nervenzelldifferenzierung oder durch Zell/Zell-Information durch Substanzfreisetzung gekennzeichnet ist. Beispiele für neurologische Erkrankungen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Neurofibromatose und periphere Neuropathie.

**[0059]** Die Bezeichnung "Herzerkrankung" bezieht sich auf oder beschreibt das physiologische Leiden bei Säugetieren, das typischerweise durch Herzzellwachstum und -differenzierung charakterisiert ist. Ein Beispiel für eine Herzerkrankung umfasst, ist jedoch nicht beschränkt auf, Herzhypertrophie und Herzversagen, einschließlich Stauungsinsuffizienz, Myokardinfarkt und Tachyarrhythmie. "Herzversagen" bezieht sich auf eine Anomalie der Herzfunktion, bei der das Herz das Blut nicht mit der Geschwindigkeit pumpt, die für Metabolismusgewebe erforderlich wäre.

#### Ausführungsformen der Erfindung

**[0060]** Die Präparate der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise durch In-vitro-Modifikation von rekombinant hergestellten Glykoproteinen gewonnen. Fachleute werden erkennen, dass sowohl die Struktur des angebundenen Oligosaccharids als auch die Effizienz der Glykosylierung je nach dem Verfahren, das zur Glykoproteinherstellung eingesetzt wird, variieren. Die Strukturen der Oligosaccharide, die an bestimmte Glykosylierungsstellen gebunden sind, variieren im Allgemeinen auch im Fall von monoklonalen Antikörpern. Daher werden typischerweise multiple Glykoformen innerhalb einer gegebenen Produktion oder Charge von monoklonalen sowie polyklonalen Antikörpern vorkommen. Die vorliegende Erfindung sorgt dafür, dass eine im Wesentlichen homogene Glykoform gewonnen werden kann und dass, gemäß bestimmten Ausführungsformen, die Glykoform im Vergleich mit der heterogenen Glykoform eine günstige Bioaktivität aufweist.

**[0061]** Die Glykoproteine der vorliegenden Erfindung können mittels bekannter Verfahren hergestellt werden, einschließlich, jedoch nicht eingeschränkt auf, Genexpressionssysteme, um die Herstellung von intakten Glykoproteinen zu ermöglichen, die eine CH2-Domäne in jedem der zahlreichen verschiedenen Wirtssysteme umfassen. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Expressionssysteme können beispielsweise zur Herstellung der Glykoproteine der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wobei jedoch eukaryotische Expressionssysteme bevorzugt sind, da Antikörpern, die in prokaryotischen Zellsystemen produziert wurden, Kohlenhydrat fehlt.

#### Isolieren der Antikörper

**[0062]** Nun folgen Verfahren zum Isolieren von Antikörpern und zur Herstellung von Immunoadhäsinen. Es versteht sich jedoch, dass das Glykoprotein unter Verwendung von Verfahren isoliert werden kann, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind.

## (i) Antikörperherstellung

**[0063]** Mehrere Verfahren zur Herstellung von Antikörpern wurden bereits beschrieben, umfassend das traditionelle Hybridomverfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, Rekombinationsverfahren zur Herstellung von Antikörpern (einschließlich chimärer Antikörper, z.B. humanisierter Antikörper), Antikörperherstellung in transgenen Tieren und die erst jüngst beschriebene Phagendisplay-Technologie zur Herstellung "vollständig menschlicher" Antikörper. Diese Verfahren werden nachstehend kurz beschrieben.

**[0064]** Polyklonale Antikörper gegen das Antigen von Interesse können im Allgemeinen in Tieren durch zahlreiche subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektionen des Antigens und eines Adjuvans gezüchtet werden. Es kann von Nutzen sein, das Antigen (oder ein Fragment, das die Target-Aminosäuresequenz enthält) an ein Protein zu konjugieren, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen ist, z.B. Schlüssellock-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin oder Sojabohnentrypsin-Inhibitor, und dies unter Verwendung eines bifunktionellen oder derivatisierenden Mittels, wie beispielsweise Maleinimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation durch Cysteinreste), N-Hydroxysuccinimid (durch Lysinreste), Glutaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid,  $\text{SOCl}_2$  oder  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , worin R und  $\text{R}^1$  unterschiedliche Alkylgruppen sind. Tiere werden gegen die immunogenen Konjugate oder Derivate durch Kombinieren von 1 mg oder 1  $\mu\text{g}$  Konjugat (für Kaninchen bzw. Mäuse) mit 3 Volumina von komplettem Freundschem Adjuvans und Injizieren der Lösung intradermal an mehreren Stellen immunisiert. Ein Monat später werden die Tiere mit 1/5 oder 1/10 der ursprünglichen Menge von Konjugat in komplettem Freundschem Adjuvans durch subkutane Injektion an mehreren Stellen geboostet. 7 bis 14 Tage später wird den Tieren Blut abgenommen, und das Serum wird auf Antikörper-Titer getestet. Die Tiere werden bis zur Titersättigung geboostet. Vorzugsweise wird das Tier mit dem Konjugat desselben Antigens, das jedoch an ein anderes Protein und/oder durch einen anderen Vernetzer konjugiert ist, geboostet. Konjugate können auch in rekombinanter Zellkultur als Proteinfusionen gebildet werden. Auch Aggregationsmittel wie beispielsweise Alaun werden verwendet, um die Immunantwort zu verstärken.

**[0065]** Monoklonale Antikörper werden aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern unter Verwendung des Hybridomverfahrens, das als erstes von Kohler & Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), beschrieben wurde, erhalten, oder sie können durch DNA-Rekombinationsverfahren (Cabilly et al., US-Patent Nr. 4.816.567) hergestellt werden. Im Hybridomverfahren wird eine Maus oder ein anderes geeignetes Wirtstier, wie beispielsweise ein Hamster, wie hierin zuvor beschrieben immunisiert, um Lymphozyten hervorzurufen, die Antikörper produzieren oder die in der Lage sind, diese Antikörper zu produzieren, die sich spezifisch an das Protein binden, das zur Immunisierung verwendet wird. Alternativ dazu können Lymphozyten in vitro immunisiert werden. Lymphozyten werden dann mit Myelomzellen unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie beispielsweise Polyethylenglykol, fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103 [Academic Press, 1986]). Die so hergestellten Hybridomzellen werden in ein geeignetes Kulturmedium geimpft und dort gezüchtet, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten, verwandten Myelomzellen hemmt. Fehlt beispielsweise den verwandten Myelomzellen das Enzym Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT), so umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium), Substanzen, die das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen unterbinden. Bevorzugte Myelomzellen sind jene, die effizient fusionieren, stabile Expression großer Mengen von Antikörper durch die ausgewählten, Antikörper produzierenden Zellen unterstützen und gegenüber einem Medium wie beispielsweise dem HAT-Medium empfindlich sind. Unter diesen sind bevorzugte Myelomzelllinien Mausmyelomlinien, wie jene, die aus MOPC-21- und MPC-11-Maustumoren stammen, die beim Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, USA, erhältlich sind, und SP2-Zellen, die bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, erhältlich sind. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden auch bereits für die Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper beschrieben (Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984); und Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)). Siehe auch Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1), 86-95 (1991), und WO 91/17769, veröffentlicht am 28. November 1991, für Verfahren zur Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper. Das Kulturmedium, in dem Hybridomzellen wachsen, wird auf die Produktion monoklonaler Antikörper, die gegen das Antigen von Interesse gerichtet sind, getestet. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität monoklonaler Antikörper, die von Hybridomzellen produziert werden, durch Immunfällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest, wie beispielsweise Radioimmuntest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), bestimmt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107, 220 (1980), bestimmt werden. Nachdem Hybridomzellen identifiziert wurden, die Antikörper der erwünschten Spezifität, Affinität und/oder Aktivität produzieren, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und durch herkömmliche Verfahren gezüchtet werden. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-104

(Academic Press, 1986). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium oder RPMI-1640-Medium. Darüber hinaus können die Hybridomzellen in vivo als Ascites-Tumoren in einem Tier gezüchtet werden. Die monoklonalen Antikörper, die von den Subklonen sekretiert werden, werden geeigneterweise vom Kulturmedium, der Ascites-Flüssigkeit oder dem Serum mittels herkömmlicher Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie beispielsweise Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatit-Chromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, getrennt.

**[0066]** Alternativ dazu ist es nun möglich, transgene Tiere (z.B. Mäuse) herzustellen, die in der Lage sind, durch Immunisierung ohne gleichzeitige endogene Immunglobulinproduktion ein vollständiges Repertoire an menschlichen Antikörpern zu produzieren. Beispielsweise wurde beschrieben, dass die homozygote Deletion des Antikörper-Schwerketten-Verbindungsregion- ( $J_H$ -) Gens in chimären und Keimlinien-mutierten Mäusen zur vollständigen Hemmung endogener Antikörperproduktion führt. Der Transfer der menschlichen Keimlinien-Immunglobulin-Genanordnung in solche Keimlinien-mutierten Mäuse resultiert in der Produktion von menschlichen Antikörpern bei Antigen-Challenge. Siehe z.B. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993), und Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993).

**[0067]** In einer weiteren Ausführungsform können Antikörper oder Antikörperfragmente aus Antikörper-Phagenbibliotheken, die mittels der in McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990), beschriebenen Verfahren gebildet werden, unter Verwendung des Antigens von Interesse zur Selektion eines geeigneten Antikörpers oder Antikörperfragments isoliert werden. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 22, 581-597 (1991), beschreiben das Isolieren von Maus- bzw. menschlichen Antikörpern unter Verwendung von Phagenbibliotheken. Darauf folgende Veröffentlichungen beschreiben die Herstellung von menschlichen Antikörpern mit hoher Affinität (im nM-Bereich) durch Kettenneukombination (Mark et al., Bio/Technol. 10, 779-783 (1992)) sowie kombinatorische Infektion und In-vivo-Rekombination als eine Strategie zur Konstruktion sehr großer Phagenbibliotheken (Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21, 2265-2266 (1993)). Somit sind diese Verfahren durchführbare Alternativen zu herkömmlichen Monoklonalantikörper-Hybridomverfahren zur Isolierung "monoklonaler" Antikörper (insbesondere menschlicher Antikörper), die in der vorliegenden Erfindung eingebunden sind.

**[0068]** Verfahren zum Humanisieren nicht-menschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in ihn aus einer nicht-menschlichen Quelle eingeführt werden. Diese nicht-menschlichen Aminosäurereste werden oft als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise aus einer variablen "Import"-Domäne entnommen werden. Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1986)) durch Substitution von Nagetier-CDRs oder -CDR-Sequenzen anstelle der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers erfolgen. Demgemäß sind solche "humanisierte" Antikörper chimäre Antikörper (Cabilly, s.o.), worin wesentlich weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies substituiert wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen einige CDR-Reste, und möglicherweise einige FR-Reste, durch Reste aus analogen Stellen in Nagetier-Antikörpern substituiert werden. Es ist wichtig, dass Antikörper unter Beibehaltung hoher Affinität zum Antigen und anderer günstiger biologischer Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden gemäß einem bevorzugten Verfahren humanisierte Antikörper durch ein Verfahren der Analyse verwandter Sequenzen und verschiedener konzeptueller humanisierter Produkte unter Verwendung von dreidimensionalen Modellen der verwandten und humanisierten Sequenzen hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulinmodelle sind Fachleuten bekannt. Computerprogramme sind erhältlich, die mögliche dreidimensionale Konformationsstrukturen ausgewählter Kandidaten-Immunglobulinsequenzen veranschaulichen und darbieten. Eine Untersuchung dieser Darbietungen ermöglicht eine Analyse der wahrscheinlichen Rolle der Reste beim Funktionieren der Kandidaten-Immunglobulinsequenz, d.h. die Analyse von Resten, die die Fähigkeit des Kandidaten-Immunglobulins beeinflussen, sein Antigen zu binden. Auf diese Weise können FR-Reste ausgewählt und von der Consensus- und Importsequenz so kombiniert werden, dass die erwünschte Antikörper-Eigenschaft, wie beispielsweise gesteigerte Affinität zu dem oder den Target-Antigen(en), erreicht wird. Für weitere Details siehe WO 92/22653, veröffentlicht am 23. Dezember 1992.

**[0069]** Immunglobuline (Ig) und bestimmte Varianten davon sind bekannt, und zahlreiche wurden in rekombinanter Zellkultur hergestellt. Für die zuvor beschriebenen Antikörper ist die Verwendung von menschlichen IgG<sub>1</sub>-Immunglobulinsequenzen bevorzugt, da diese Struktur die CH<sub>2</sub>-Domäne der vorliegenden Erfindung enthält. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4.745.055; EP 256.654; Faulkner et al., Nature 298, 286 (1982); EP 120.694; EP 125.023; Morrison, J. Immun. 123, 793 (1979); Köhler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2197

(1980); Raso et al., *Cancer Res.* 41, 2073 (1981); Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2, 239 (1984); Morrison, *Science* 229, 1202 (1985); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851 (1984); EP 255.694; EP 266.663; und WO 88/03559.

**[0070]** Bevorzugte Antikörper innerhalb des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung umfassen Anti-IL-8 (St John et al., *Chest* 103, 932 (1993), und die Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/23865); Anti-CD11a (Filcher et al., *Blood* 77, 249-256, Steppe et al., *Transplant Intl.* 4, 3-7 (1991), und Hourmant et al., *Transplantation* 58, 377-380 (1994)); Anti-IgE (Presta et al., *J. Immunol.* 151, 2623-2632 (1993), und die Internationale Veröffentlichung Nr. WO 95/19181); Anti-HER2 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-4289 (1992), und die Internationale Veröffentlichung Nr. WO 92/20798); Anti-VEGF (Jin Kim et al., *Growth Factors* 7, 53-64 (1992), und die Internationale Veröffentlichung Nr. WO 96/30046); und Anti-CD20 (Maloney et al., *Blood* 84, 2457-2466 (1994), Liu et al., *J. Immunol.* 130, 3521-3526 (1987)).

## ii) Immunoadhäsinerstellung

**[0071]** Chimären, die aus einer Adhäsion-Bindungsdomänensequenz konstruiert werden, die an eine geeignete konstante Immunglobulin-domänensequenz (Immunoadhäsion) gebunden ist, sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Immunoadhäsine, von denen in der Literatur bereits berichtet wurde, umfassen Fusionen von CD4 (Capon et al., *Nature* 337, 525-531 (1989); Traunecker et al., *Nature* 339, 68-70 (1989); Zettmeissl et al., *DNA Cell Biol. USA* 9, 347-353 (1990); und Byrn et al., *Nature* 344, 667-670 (1990)); L-Selectin (Homing-Rezeptor) (Watson et al., *J. Cell. Biol.* 110, 2221-2229 (1990); und Watson et al., *Nature* 349, 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., *Cell* 61, 1303-1313 (1990)); CD28 und B7 (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 173, 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley et al., *J. Exp. Med.* 174, 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic et al., *Cell* 66, 1133-1144 (1991)); TNF-Rezeptor (Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10535-10539 (1991); Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 27, 2883-2886 (1991); und Peppel et al., *J. Exp. Med.* 174, 1483-1489 (1991)); und IgE-Rezeptor  $\alpha$  (Ridgway & Gorman, *J. Cell. Biol.* 115, Abstract Nr. 1448 (1991)).

**[0072]** Typischerweise behält in solchen Fusionen das kodierte chimäre Polypeptid zumindest funktionell aktive Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen der konstanten Region einer Immunglobulin-Schwerkette bei. Fusionen erfolgten ebenfalls an den C-Terminus des Fc-Abschnitts einer konstanten Domäne oder unmittelbar N-terminal zu CH1 der Schwerkette oder der entsprechenden Region der Leichtkette. Der genaue Ort, an der die Fusion ausgeführt wird, ist nicht entscheidend; besondere Stellen sind allgemein bekannt und können ausgewählt werden, um die biologische Aktivität, Sekretion oder Bindungseigenschaften der Ia zu optimieren.

**[0073]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Adhäsionssequenz an den N-Terminus der Fc-Domäne des Immunglobulins G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) fusioniert. Es ist möglich, die gesamte konstante Region der Schwerkette an die Adhäsionssequenz zu fusionieren. Dennoch wird noch bevorzugter eine Sequenz in der Fusion verwendet, die in der Gelenksregion knapp stromauf von der Papain-Spaltungsstelle, die IgG-Fc chemisch bestimmt (d.h. Rest 216, wenn der erste Rest der konstanten Schwerkettenregion als 114 angenommen wird), oder analogen Stellen anderer Immunglobuline beginnt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Adhäsion-Aminosäuresequenz an (a) die Gelenksregion und CH2 und CH3 oder (b) an die CH1-, Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen einer IgG<sub>1</sub>-Schwerkette fusioniert. Die exakte Stelle, an der die Fusion durchgeführt wird, ist nicht maßgeblich, und die optimale Stelle kann mittels Routineversuchen bestimmt werden.

**[0074]** Für bispezifische Immunoadhäsine werden die Immunoadhäsine als Multimere angeordnet und insbesondere als Heterodimere oder Heterotetramere. Im Allgemeinen weisen diese angeordneten Immunglobuline bekannte Einheitsstrukturen auf. Eine grundlegende Vierketten-Struktureinheit ist die Form, in der IgG, IgD und IgE existieren. Eine Vierketteneinheit ist in den höhermolekularen Immunglobulinen wiederholt; IgM existiert im Allgemeinen als ein Pentamer von vier Grundeinheiten, die durch Disulfidbindungen zusammengehalten werden. IgA-Globulin, und gelegentlich IgG-Globulin, können auch in multimeren Formen in Serum bestehen. Im Fall von Multimer kann jede dieser vier Einheiten dieselbe oder eine andere sein.

**[0075]** Verschiedene Beispiele angeordneter Immunoadhäsine, die im Schutzzumfang der Erfindung liegen, sind nachstehend schematisch dargestellt:

- (a) AC<sub>H</sub>-[AC<sub>H</sub>, AC<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>, AC<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, oder V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>];
- (b) AC<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>-[AC<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>, AC<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>, oder V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>G<sub>H</sub>];
- (c) AC<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>-[AC<sub>H</sub>, oder AC<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, oder V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>];
- (d) V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>-[AC<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, oder V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-AC<sub>H</sub>]; und
- (e) [A-Y]<sub>n</sub>-[V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>]<sub>2</sub>,

worin jedes A für identische oder unterschiedliche Adhäsion-Aminosäuresequenzen steht;

- V<sub>L</sub> eine variable Immunglobulin-Leichtkettendomäne ist;  
 V<sub>H</sub> eine variable Immunglobulin-Schwerkettendomäne ist;  
 C<sub>L</sub> eine konstante Immunglobulin-Leichtkettendomäne ist;  
 C<sub>H</sub> eine konstante Immunglobulin-Schwerkettendomäne ist;  
 n eine ganze Zahl größer 1 ist;  
 Y den Rest eines kovalenten Vernetzers bezeichnet.

**[0076]** Um die Darstellung so kurz wie möglich zu halten, zeigen die obigen Strukturen nur Hauptmerkmale; sie geben weder Bindungs- (J-) oder andere Domänen der Immunglobuline an, noch sind Disulfidbindungen gezeigt. Wo solche Domänen jedoch für Bindungsaktivität erforderlich sind, so soll ihre Anwesenheit in den üblichen Positionen, die sie in den Immunglobulinmolekülen einnehmen, als gegeben angenommen werden.

**[0077]** Alternativ dazu können die Adhäsionsequenzen zwischen Immunglobulin-Schwerketten- und -Leichtkettensequenzen inseriert werden, sodass ein Immunglobulin erhalten wird, das eine chimäre Schwerkette umfasst. In dieser Ausführungsform werden die Adhäsionsequenzen an das 3'-Ende einer Immunglobulin-Schwerkette in jedem Arm eines Immunglobulins inseriert, entweder zwischen der Gelenks- und der CH2-Domäne oder zwischen den CH2- und CH3-Domänen. Über ähnliche Konstrukte berichteten Hoogenboom et al., Mol. Immunol. 28, 1027-1037 (1991).

**[0078]** Obwohl die Gegenwart einer Immunglobulin-Leichtkette in den Immunoadhäsinen der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich ist, kann eine Immunglobulin-Leichtkette entweder kovalent an ein Adhäsion-Immunglobulin-Schwerketten-Fusionspolypeptid assoziiert oder direkt an das Adhäsion fusioniert vorhanden sein. Im ersten Fall wird die DNA, die für eine Immunglobulin-Leichtkette kodiert, typischerweise mit der DNA, die für das Adhäsion-Immunglobulin-Schwerketten-Fusionsprotein kodiert, co-exprimiert. Bei der Sekretion werden die hybride Schwerkette und die Leichtkette kovalent assoziiert, um eine Immunglobulin-ähnliche Struktur bereitzustellen, die zwei Disulfid-gebundene Immunglobulin-Schwerketten-Leichtketten-Paare umfasst. Verfahren, die zur Herstellung solcher Strukturen geeignet sind, sind beispielsweise im US-Patent Nr. 4.816.567, ausgegeben am 28. März 1989, offenbart.

**[0079]** In einer bevorzugten Ausführungsform stammen die Immunglobulinsequenzen, die zur Konstruktion der Immunoadhäsine der vorliegenden Erfindung verwendet werden, aus einer konstanten IgG-Immunglobulin-Schwerkettendomäne. Für menschliche Immunoadhäsine wird die Verwendung der menschlichen IgG<sub>1</sub>-Immunglobulinsequenzen bevorzugt, da diese Struktur die CH2-Domäne der vorliegenden Erfindung enthält. Ein großer Vorteil der Verwendung von IgG<sub>1</sub> ist, dass IgG<sub>1</sub>-Immunoadhäsine effizient an immobilisiertem Protein A gereinigt werden kann. Dahingegen erfordert die Reinigung von IgG<sub>3</sub> Protein G, ein signifikant weniger vielseitiges Medium. Dennoch sollten bei der Auswahl des Ig-Fusionspartners für eine bestimmte Immunoadhäsinkonstruktion auch andere strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Immunglobulinen in Erwägung gezogen werden. Beispielsweise ist das IgG<sub>3</sub>-Gelenk länger und flexibler, sodass es größere "Adhäsion"-Domänen aufnehmen kann, die sich eventuell nicht falten oder nicht geeignet funktionieren, wenn sie an IgG<sub>1</sub> fusioniert sind. Eine andere Überlegung kann auch die Wertigkeit betreffen; IgG-Immunoadhäsine sind zweiwertige Homodimere, während Ig-Subtypen wie IgA und IgM dimere bzw. pentamere Strukturen der Ig-Homodimereinheit entstehen lassen können. Für Immunoadhäsine, die für In-vivo-Anwendungen entworfen werden, sind auch die pharmakokinetischen Eigenschaften und Effektorfunktionen, die durch die Fc-Region spezifiziert werden, von Bedeutung. Obwohl IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> alle In-vivo-Halbwertszeiten von 21 Tagen haben, sind ihre relativen Möglichkeiten, das Komplementsystem zu aktivieren, unterschiedlich. IgG<sub>4</sub> aktiviert das Komplement nicht, und IgG<sub>2</sub> ist signifikant schwächer bei der Komplementaktivierung als IgG<sub>1</sub>. Darüber hinaus bindet anders als IgG<sub>1</sub> IgG<sub>2</sub> sich nicht an Fc-Rezeptoren an mononuklearen Zellen oder Neutrophilen, was auf die Unterschiede in CH2-Domänen zurückzuführen sein kann, die in diesen Isotypen verwendet werden. Während IgG<sub>3</sub> optimal zur Komplementaktivierung ist, beträgt seine In-vivo-Halbwertszeit etwa ein Drittel jener der anderen IgG-Isotypen. Eine andere wichtige Überlegung für Immunoadhäsine, die zur Verwendung als Therapeutika für Menschen entwickelt werden, ist die Anzahl allotypischer Varianten des bestimmten Isotyps. Im Allgemeinen werden IgG-Isotypen mit weniger serologisch definierten Allotypen bevorzugt. Beispielsweise weist IgG<sub>1</sub> nur vier serologisch definierte allotypische Stellen auf, von denen zwei (G1m und 2) in der Fc-Region angeordnet sind; und eine dieser Stellen, G1m1, ist nicht-immunogen. Dahingegen weist IgG<sub>3</sub> 12 serologisch definierte Allotypen auf, die sich alle in der Fc-Region befinden; nur drei dieser Stellen (G3m5, 11 und 21) haben einen Allotyp, der nicht-immunogen ist. Somit ist die potentielle Immunogenität eines γ3-Immunoadhäsins größer als jene eines γ1-Immunoadhäsins. Bevorzugt unter den Immunoadhäsinen sind jene, die zumindest die IgG1-CH2-Domäne umfassen, wie hierin beschrieben.

**[0080]** Immunoadhäsine werden sehr einfach durch Fusionieren der cDNA-Sequenz, die für den Adhäsinschnitt im Raster kodiert, an eine Ig-cDNA-Sequenz konstruiert. Die Fusion an genomische Ig-Fragmente kann jedoch auch verwendet werden (siehe z.B. Aruffo et al., Cell 61, 1303-1313 (1990); und Stamenkovic et al., Cell 66, 1133-1144 (1991)). Der letztgenannte Fusionstyp erfordert die Gegenwart von Ig-Regulationssequenzen zur Expression. cDNAs, die für konstante IgG-Schwerkettenregionen kodieren, können auf Grundlage veröffentlichter Sequenzen aus cDNA-Bibliotheken, die aus Milz- oder Peripherblutlymphozyten stammen, durch Hybridisierungs- oder Polymerasekettenreaktions- (PCR-) Verfahren isoliert werden. Die cDNAs, die für das "Adhäsins" kodieren, und Ig-Teile des Immunoadhäsins werden gemeinsam in einen Plasmidvektor inseriert, der wirksame Expression in ausgewählten Wirtszellen steuert.

#### Herstellung des Glykoproteins

**[0081]** DNA, die für die Glykoproteine der Erfindung kodiert, kann unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. unter Verwendung von Oligonucleotid-Sonden, die in der Lage sind, sich spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten von Maus-Antikörpern kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als eine bevorzugte Quelle solcher DNA. Nachdem die DNA isoliert wurde, kann sie in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen wie beispielsweise Affen-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock- (CHO-) Zellen oder Myelomzellen transferiert werden, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erreichen. Die DNA kann auch z.B., um nur ein Beispiel zu nennen, durch Substituieren der Codiersequenz für menschliche konstante Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle der homologen Mausequenzen modifiziert werden; Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984), wie zuvor beschrieben.

**[0082]** Verschiedene Techniken zur Herstellung und Isolation von Antikörper und Immunoadhäsins und dergleichen direkt aus rekombinanter Zellkultur wurden auch bereits beschrieben. Insbesondere die Zellen, die das erwünschte Glykoprotein exprimieren, sollten die bestimmten Enzyme exprimieren oder sollten manipuliert werden, um sie zu exprimieren, sodass unter den geeigneten Bedingungen die geeignete posttranslationale Modifikation in vivo eintritt. Die Enzyme binden jene Enzyme ein, die für den Zusatz und die Vervollständigung von N- und O-gebundenen Kohlenhydraten erforderlich sind, wie beispielsweise jene, die in Hubbard & Ivan, s.o., für N-gebundene Oligosaccharide beschrieben wurden. Die Enzyme binden gegebenenfalls Oligosaccharyltransferase,  $\alpha$ -Glucosidase I,  $\alpha$ -Glucosidase II, ER- $\alpha$ (1,2)Mannosidase, Golgi- $\alpha$ -Mannosidase I, N-Acetylglucosaminyltransferase I, Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II, N-Acetylglucosaminyltransferase II,  $\alpha$ (1,6)Fucosyltransferase und  $\beta$ (1,4)Galactosyltransferase ein.

**[0083]** Typischerweise sind die Zellen in der Lage, große Mengen eines bestimmten Glykoproteins von Interesse im Kulturmedium zu exprimieren oder in dieses zu sekretieren. Beispiele für geeignete Säugetier-Wirtszellen im Rahmen der vorliegenden Erfindung können Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub & Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); dp12.CHO-Zellen (EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989); Affennieren-CV1-Linie, transformiert durch SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); menschliche embryonale Nierenlinie (293 oder 293-Zellen, subkloniert zum Wachstum in Suspensionskultur, Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)); Babyhamsternierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); Maus-Sertolizellen (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)); Affennierenzellen (CV1 ATCC CCL 70); "African-Green-Monkey-Kidney"-Zellen (VERO-76, ATCC CRL-1587); menschliche Cervixkarzinomzellen (HELA, ATCC CCL 2); Hundenierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Büffelrattenleberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Maus-Mammatumors (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-Zellen (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44-68 (1982)); MRC5-Zellen; FS4-Zellen; und menschliche Hepatomlinie (Hep G2) umfassen.

**[0084]** Bevorzugte Wirtszellen umfassen Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub & Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)) und dp12.CHO-Zellen (EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989).

**[0085]** Für die Kultur der Säugetierzellen, die das erwünschte Protein exprimieren und in der Lage sind, die erwünschten Kohlenhydrate in spezifischer Position und Bindung hinzuzufügen, können unter besonderer Berücksichtigung der zu kultivierenden Wirtszellen zahlreiche Kulturbedingungen verwendet werden. Geeignete Kulturbedingungen für Säugetierzellen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt (J. Immunol. Methods 56, 221-234 (1983)) oder können leicht von Fachleuten festgelegt werden (siehe beispielsweise Animal Cell Culture: A Practical Approach, 2. Auflage, D. Rickwood & B.D. Hames (Hrsg.), Oxford University Press, New York (1992)) und variieren je nach der bestimmten ausgewählten Wirtszelle.

**[0086]** Das Glykoprotein von Interesse wird vorzugsweise aus dem Kulturmedium in Form eines sekretierten Polypeptids gewonnen, obwohl es auch aus Wirtszelllysaten gewonnen werden kann.

**[0087]** In einem ersten Schritt wird das Kulturmedium oder Lysat zentrifugiert, um Partikelzelltrümmer zu entfernen. Das Polypeptid wird hiernach von verunreinigenden löslichen Proteinen und Polypeptiden gereinigt, wobei die folgenden Verfahren für geeignete Reinigungsverfahren als Beispiele genannt werden können: Fraktionierung an Immunoaffinitäts- oder Ionenaustauschssäulen; Ethanol-fällung; Umkehrphasen-HPLC; Chromatographie auf Siliciumdioxid oder einem Kationenaustauschharz wie beispielsweise DEAE; Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfatfällung; Gelfiltration unter Verwendung von beispielsweise Sephadex G-75; und Protein-A-Sepharosesäulen zur Entfernung von Verunreinigungen wie beispielsweise IgG. Ein Protease-Inhibitor wie beispielsweise Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) kann auch nützlich sein, um proteolytischen Abbau während der Reinigung zu hemmen. Fachleuten wird bekannt sein, dass Reinigungsverfahren, die für das Polypeptid von Interesse geeignet sind, Modifikationen erfordern können, um Änderungen der Eigenschaft des Polypeptids bei der Expression in rekombinanter Zellkultur Rechnung zu tragen.

**[0088]** Besonders bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reinigungsverfahren und -methoden, die eine Selektion auf die Kohlenhydrate der Erfindung durchführen.

**[0089]** Die Anbindung eines Galactoserests an ein bestehendes Glycan bindet den Transfer einer Galactosegruppierung aus einer aktivierten Galactose-hältigen Verbindung zur Glykosylgruppierung der CH<sub>2</sub>-Domäne ein. Der Transfer von Galactose wird durch ein Galactosyltransferase-Enzym katalysiert.

**[0090]** Während Fachleute auch sicherlich erkennen werden, dass jedes beliebige mehrerer Standardverfahren auf dem Gebiet der Erfindung zum Hinzufügen eines Zuckers zu einer bereits existierenden Oligosaccharidkette verwendet werden kann, verwendet die Erfindung doch vorzugsweise jene Verfahren, die in vollständiger Galactosylierung der hierin beschriebenen Probe resultieren. Unter vollständiger Galactosylierung der Probe wird verstanden, dass jede fñhlerartige Struktur des nativen doppelfñhlerartigen Oligosaccharids mit einem Galactoserest verkappt ist oder in einem Galactoserest endet. Spezifischer ausgedrñckt ist die Reaktion abgeschlossen, wenn im Wesentlichen alle N-gebundenen Oligosaccharide der G<sub>2</sub>-Variation zuzuordnen sind.

**[0091]** Gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzungen der Erfindung die Schritte des Umsetzens in einer wässrigen gepufferten Lösung bei einer Temperatur von etwa 25-40 °C:

- a) eines Metallsalzes in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 25 mM;
- b) einer aktivierten Galactose in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 50 mM;
- c) einer Galactosyltransferase in einer Konzentration von etwa 1 mU/ml bis etwa 100 mU/ml;
- d) eines Substrat-Glykoproteins; und des Gewinnens des Glykoproteins.

**[0092]** Wie hierin verwendet beziehen sich die Bezeichnungen Galactose (gal) und Galactoserest und dergleichen auf D- und L- ((+/-)-) Galactose. Vorzugsweise ist gal D-(+)-Galactose, von der berichtet wurde, dass sie eine natürlich vorkommende gal in vielen verschiedenen Tierspezies ist.

**[0093]** Die aktivierte Galactose-hältige Verbindung ist im Allgemeinen eine Uridindiphosphat- (UDP-) Galactose, Uridindiphosphat-Galactose und andere Donorzucker, die in der Lage sind, Galactose auf N-gebundene Oligosaccharide zu transferieren.

**[0094]** Metallsalze umfassen beispielsweise MnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> und andere.

**[0095]** Die Galactosyltransferase, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist vorzugsweise eine β-1-4-Transferase und katalysiert den Transfer einer Galactosegruppierung vom aktivierten Substrat zur Glykosylverbindung. Die Galactosyltransferase-Enzyme sind substratspezifisch und werden gemäß ihrer Substratspezifität benannt. Die Galactosyltransferase, die als β-1-4 bezeichnet wird, bezieht sich auf eine Galactosyltransferase, die den Transfer von Galactose zu einer Hydroxylgruppe einer Glykosylakzeptorverbindung katalysiert. Beispiele für Galactosyltransferasen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlich sind, stammen von Menschen, Rindern, Mäusen, Hamstern oder Affen.

**[0096]** Galactosyltransferasen sind im Handel erhältlich (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind., und Genzyme, Cambridge, MA). Alternativ dazu werden Galactosyltransferasen aus Tiergewebe wie beispielsweise Rindergewebe isoliert und gereinigt (Boeggeman et al., Prot. Eng. 6(7), 779-785 (1993)) oder aus menschlichem Gewebe (Schwienteck, Gene 145(2), 299-303 (1994); Kleene et al.,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 201(1), 160-167 (1994); Chatterjee et al., Int. J. Biochem Cell. Biol. 27(3), 329-336 (1995); Herrmann et al., Protein Expr. Purif. 6(1), 72-78 (1995)).

**[0097]** Die Konzentration und Menge der verschiedenen, zuvor beschriebenen Reaktionspartner hängt von zahlreichen Faktoren ab, einschließlich der Reaktionsbedingungen wie beispielsweise Temperatur und pH sowie der Menge an zu galactosylierendem Glykoprotein. Während angenommen wird, dass das vorliegende Verfahren im Allgemeinen auf alle Glykoproteine anwendbar ist, sind bevorzugte Glykoproteine zur Verwendung im vorliegenden Verfahren Glykoproteine, die zumindest die CH<sub>2</sub>-Domäne der zuvor beschriebenen Immunglobuline umfassen.

**[0098]** Die Galactosyltransferase wird in einer katalytischen Menge verwendet. Unter katalytischer Menge wird eine Menge an Galactosyltransferase verstanden, die zumindest ausreichend ist, um auf eine nicht-geschwindigkeitbestimmende Weise die Umsetzung des Enzymsubstrats zum Produkt zu katalysieren. Die katalytische Menge eines bestimmten Enzyms variiert gemäß der Menge eines bestimmten Enzymsubstrates sowie den Reaktionsbedingungen wie beispielsweise Temperatur, Dauer und pH-Wert. Enzymmengen werden im Allgemeinen in Aktivitätseinheiten ausgedrückt. Eine Einheit katalysiert die Bildung von 1 µmol Produkt bei gegebener Temperatur (typischerweise 37 °C) und pH-Wert (typischerweise 7,5) pro Minute. Somit sind 10 Einheiten eines Enzyms die katalytische Menge von diesem Enzym, wenn 10 µmol Substrat zu 10 µmol Produkt in einer Minute bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH von 6,5 bis 7,5 umgesetzt werden.

**[0099]** Die Reaktion umfasst das Vermischen von zumindest den oben genannten Bestandteilen in einer geeigneten wässrigen Umgebung, um ein Reaktionsgemisch zu bilden, und das Halten des Reaktionsgemisches unter geeigneten Bedingungen von Temperatur, pH, Osmolalität, Ionenzusammensetzung und umgebende Temperatur über eine bestimmte Zeitspanne hinweg, um die Reaktion vollständig abzuschließen.

**[0100]** Die Auswahl bestimmter Bedingungen hängt primär von der Menge des vorhandenen Glykoproteins ab. Die Temperatur kann im Bereich von etwa 20 °C bis etwa 40 °C liegen. Vorzugsweise liegt die Temperatur im Bereich von etwa 25 bis etwa 40 °C. Der pH-Wert kann im Bereich von etwa 6,0 bis etwa 11,0 liegen, vorzugsweise liegt der pH-Wert jedoch im Bereich von etwa 6,5 bis etwa 8,5, und noch bevorzugter bei etwa 7,5. Der pH wird durch Zusatz eines geeigneten Puffers zur Reaktion gehalten. Der Puffer ist frei von Phosphat, EDTA, EGTA und anderen Chelatbildnern, die Mg von Mn binden. Die Auswahl des Puffers basiert auf der Fähigkeit des Puffers, den pH bei etwa dem erwünschten pH-Wert zu halten. Beträgt der pH-Wert 7,5, so sind bevorzugte Puffer Natriumcacodylat und MES.

**[0101]** In einem Verfahren, das als Beispiel genannt werden kann, werden die Glykoproteinproben (z.B. C2B8, Anti-HER2, Anti-VEGF, Anti-IgE und TNFR-IgG) bei 10 mg in 0,5 ml in 50 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,1 (End-Vol. 1,0 ml) puffergetauscht. 50 µl von jeweils 100 mM UDP-Gal und 100 mM MnCl<sub>2</sub> werden der Glykoproteinlösung zugesetzt. Die β1,4-Galactosyltransferase (β1,4GT; lyophilisiertes Pulver) wird in 50 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,1, in einer Konzentration von 1 mU/ml aufgelöst. 50 µl dieser Lösung werden zu dem Reaktionsgemisch zugesetzt und bei 37 °C 48 Stunden lang inkubiert. Die Reaktion wird durch 10-minütiges Abkühlen der Reaktionsphiole auf einem Eisbad (4 °C) gestoppt, und der galactosylierte Antikörper wird an einer Protein-A-Säule gereinigt.

#### Analyse des Glykoproteins

**[0102]** Der komplexe Kohlenhydratabschnitt des Glykoproteins, das durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung produziert wurde, kann leicht analysiert werden, um festzustellen, ob die zuvor beschriebene Reaktion abgeschlossen ist. Die Oligosaccharide werden mittels herkömmlicher Verfahren der Kohlenhydratanalyse, wie jene, die in den beiliegenden Figuren und Beispielen beschrieben werden, analysiert. Somit zeigen beispielsweise Verfahren wie Lectin-Blotting, das auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, Anteile von terminaler Mannose oder anderen Zuckerarten wie beispielsweise Galactose auf.

**[0103]** Die Kohlenhydratstrukturen der vorliegenden Erfindung treten am Protein auf, das in Form von N-gebundenen G<sub>2</sub>-Oligosacchariden exprimiert wird. Mehrere Verfahren sind auf dem Gebiet der Glykosylierungsanalyse bekannt und sind in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung nützlich. Solche Verfahren liefern Informationen hinsichtlich der Identität und der Zusammensetzung des Oligosaccharids, das an das Peptid angebunden ist. Verfahren zur Kohlenhydratanalyse, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlich sind, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Lectin-Chromatographie; HPAEC-PAD, das Anionenaustausch-Chromatographie bei hohem pH verwendet, um Oligosaccharide auf der Basis von Ladung zu trennen; NMR; Massenspektrometrie; HPLC; GPC; Monosaccharid-Kompositionsanalyse; und sequenziellen enzyma-

tischen Verdau.

**[0104]** Darüber hinaus sind Verfahren zur Freisetzung von Oligosacchariden bekannt. Diese Verfahren umfassen 1) enzymatische, die üblicherweise unter Verwendung von Peptid-N-Glykosidase F/endo- $\beta$ -Galactosidase durchgeführt werden; 2) Eliminierung unter Verwendung einer stark alkalischen Umgebung, um hauptsächlich O-gebundene Oligosaccharide freizusetzen; und 3) chemische Verfahren unter Verwendung von wasserfreiem Hydrazin, um sowohl N- als auch O-gebundene Oligosaccharide freizusetzen.

**[0105]** Analyse kann unter Einsatz folgender Schritte durchgeführt werden:

1. Dialyse der Probe gegen entionisiertes Wasser, um alle Puffersalze zu entfernen, gefolgt von Lyophilisierung.
2. Freisetzung intakter Oligosaccharidketten mit wasserfreiem Hydrazin.
3. Behandlung der intakten Oligosaccharidketten mit wasserfreiem methanolischem HCl zur Freisetzung einzelner Monosaccharide als O-Methylderivat.
4. N-Acetylierung jeder primären Aminogruppe.
5. Derivatisierung, um per-O-Trimethylsilylmethylglykoside zu erhalten.
6. Trennung dieser Derivate durch Kapillar-GLC (Gas-Flüssigkeits-Chromatographie) an einer CP-SIL8-Säule.
7. Identifikation einzelner Glykosidderivate durch Retentionszeit aus der GLC und Massenspektroskopie unter Vergleich mit bekannten Standards.
8. Quantifizierung einzelner Derivate durch FID mit einem inneren Standard (13-O-Methyl-D-glucose).

**[0106]** Neutrale und Amino-Zucker können durch Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie, kombiniert mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAE-PAD-Kohlenhydratsystem, Dionex Corp.) bestimmt werden. Beispielsweise können Zucker durch 6 h lange Hydrolyse in 20 Vol.-% Trifluoressigsäure bei 100 EC freigesetzt werden. Hydrolysate werden dann durch Lyophilisierung oder mit einem Speed-Vac (Savant Instruments) getrocknet. Die Rückstände werden dann in 1 %iger Natriumacetattri-hydrat-Lösung aufgelöst und an einer HPLC-AS6-Säule wie von Anumula et al. (Anal. Biochem. 195, 269-280 (1991)) beschrieben analysiert.

**[0107]** Sialsäure kann einzeln durch die direkte kolorimetrische Methode von Yao et al. (Anal. Biochem. 179, 332-335 (1989)) in dreifachen Proben bestimmt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Thiobarbitursäure (TBA) von L. Warren, J. Biol. Chem. 238, 8 (1959), verwendet.

**[0108]** Alternativ dazu kann Immunoblot-Kohlenhydratanalyse durchgeführt werden. Gemäß diesem Verfahren werden Protein-gebundene Kohlenhydrate unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Glycan-Detektionssystem (Boehringer) nachgewiesen, das auf dem oxidativen Immunoblotverfahren aufbaut, welches von Haselbeck und Hosel [Haselbeck et al., Glycoconjugate J. 7, 63 (1990)] beschrieben wurde. Es wird gemäß den Färbungs-Arbeitsvorschriften des Herstellers vorgegangen, mit der Ausnahme, dass das Protein auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran anstelle einer Nitrocellulosemembran übertragen wird und dass die Blockierungspuffer 5 % Rinderserumalbumin in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, mit 0,9 % Natriumchlorid enthält. Die Detektion erfolgt mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern, die mit einem alkalischen Phosphat konjugat (Boehringer) verbunden sind, 1:1000-Verdünnung in Tris-gepufferter Salzlösung unter Verwendung der Phosphatase-Substrate, 4-Nitroblautetrazoliumchlorid, 0,03 % (Gew./Vol.), und 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat, 0,03 % (Gew./Vol.), in 100 mM Tris-Puffer, pH 9,5, der 100 mM Natriumchlorid und 50 mM Magnesiumchlorid enthält. Die Proteinbanden, die Kohlenhydrat enthalten, werden üblicherweise innerhalb von 10 bis 15 min sichtbar gemacht.

**[0109]** Das Kohlenhydrat kann auch durch Verdau mit Peptid-N-Glykosidase F analysiert werden. Gemäß diesem Verfahren wird der Rückstand in 14 Fl eines Puffers, der 0,18 % SDS, 18 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 90 mM Phosphat und 3,6 mM EDTA bei einem pH von 8,6 enthält, suspendiert und bei 100 EC 3 min lang erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Probe in zwei gleiche Teile geteilt. Eine Aliquote wird nicht weiter behandelt und dient als Kontrolle. Die zweite Fraktion wird auf etwa 1 % NP-40-Detergens eingestellt, woraufhin 0,2 Einheiten Peptid-N-Glykosidase F (Boehringer) zugesetzt werden. Beide Proben werden auf 37 °C 2 h lang erwärmt und dann mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert.

**[0110]** Bevorzugte Verfahren für die Analyse umfassen jene, die für die Analyse von Antikörperassoziierten Oligosacchariden beschrieben wurden und auch beispielsweise in Wormald et al., Biochem. 36, 1370-1380 (1997); Sheely et al., Anal. Biochem. 247, 102-110 (1997), und Cant et al., Cytotechnology 15, 223-228 (1994), sowie in den dort zitierten Verweisen beschreiben sind.

**[0111]** Die gewonnenen Glykoproteine werden gemäß bekannter Verfahren gereinigt, die zur Antikörperherstellung wie hierin beschrieben verwendet werden. Die gewonnenen und gereinigten Antikörper werden analysiert, um Primär- und Sekundärstruktur wie hierin und in den Figuren und Beispielen beschrieben zu bestätigen. Verfahren zur Analyse von intakten Glykoproteinen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt (Cant et al., *Cytotechnology* 15, 223-228 (1994); Iwase et al., *J. Biochem.* 120, 393-397 (1996); Sheeley et al., *Analytical Biochemistry* 247, 102-110 (1997)). Typischerweise folgt der strukturellen Analyse die funktionelle Analyse. Wie Fachleuten bekannt sein wird, sind die konstanten Domänen nicht direkt in die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen eingebunden, sondern zeigen verschiedene Effektorfunktionen, wie beispielsweise Beteiligung eines Antikörpers an Antikörper-abhängiger zellulärer Toxizität und komplementvermittelter Zellyse. Die Bindungsstelle an IgG für C1q, die erste Komponente der Komplement-Kaskade wurde den CH2-Domänen zugeordnet. Daher sind Standard-Analysen wie beispielsweise Tests auf komplementabhängige Zytotoxizität, wie beispielsweise jene, die für Anti-CD-20-Antikörper beschrieben werden (Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202, 163-171 (1997)), geeignet. Tests auf Antigen-vermittelte Aggregation von IgG1, IgG2 und IgG3, die Komplementaktivierung initiiert, Bindung von IgG an die Hochaffinitäts-Fc-Rezeptoren an Monozyten, die jene Zellen stimulieren können, um das Antigen, an das das Ig gebunden ist, zu eliminieren, sind zur Analyse der funktionellen Aktivität des gewonnenen Glykoproteins ebenso geeignet.

#### Therapeutische Zusammensetzungen und Verfahren

**[0112]** Bereitstellung der Glykoproteine der vorliegenden Erfindung als therapeutische Zusammensetzungen und zur Verwendung in Verfahren zur Behandlung von Erkrankungszuständen sind Ausführungsformen der Erfindung. Die hierin allgemein offenbarten Verwendungen sind als Leitfaden für die Verwendung der Präparate im Allgemeinen bereitgestellt. Der monoklonale Antikörper C2B8 (Anti-CD20) ist als ein Beispiel für einen monoklonalen Antikörper bereitgestellt, der wie zuvor erwähnt zur Krebsbehandlung entwickelt wird.

**[0113]** Therapeutische Formulierungen eines Antikörpers werden durch Vermischen des Antikörpers, der den erwünschten Reinheitsgrad aufweist, mit optionalen physiologisch annehmbaren Trägern, Arzneimittelträgern oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980)) in Form eines gefriergetrockneten Kuchens oder von wässrigen Lösungen lagerfähig gemacht. Pharmazeutisch annehmbare Träger, Arzneimittelträger oder Stabilisatoren sind bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen für den Rezipienten nicht toxisch und umfassen Puffer wie beispielsweise Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidanzien einschließlich Ascorbinsäure; niedermolekulare Polypeptide (weniger als etwa 10 Reste); Proteine wie beispielsweise Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie beispielsweise Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner wie EDTA; Zuckeralkohole wie beispielsweise Mannit oder Sorbit; salzbildende Gegenionen wie Natrium; und/oder nichtionische Tenside wie Tween<sup>TM</sup>, Pluronic<sup>TM</sup> oder Polyethylenglykol (PEG).

**[0114]** Ein zur In-vivo-Verabreichung zu verwendender Antikörper muss steril sein. Dies kann, vor oder nach der Lyophilisierung und Wiederherstellung, leicht durch Filtrationsmembranen erreicht werden. Die Formulierung wird üblicherweise in lyophilisierter Form oder in Lösung gelagert.

**[0115]** Therapeutische Antikörper-Zusammensetzungen werden im Allgemeinen in einen Behälter gegeben, der eine sterile Zugangsöffnung aufweist, beispielsweise in einen intravenösen Lösungsbeutel oder eine Phiole mit einem Septum, das mit einer Nadel für subkutane Injektion durchstoßen werden kann.

**[0116]** Der Verabreichungsweg steht in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren, z.B. intravenöse, intraperitoneale, intrazerebrale, intramuskuläre, intraokulare, intraarterielle oder intraläsionale Injektion oder Infusion oder Injektion oder Infusion mittels Retard-Systemen, wie nachstehend erläutert wird. Der Antikörper wird kontinuierlich durch Infusion oder durch Bolusinjektion verabreicht.

**[0117]** Ein Krebspatient, der mit einem Antikörper als Antagonisten, wie hierin offenbart, zu behandeln ist, kann auch Bestrahlungstherapie erhalten. Alternativ oder zusätzlich dazu kann dem Patienten ein chemotherapeutisches Mittel verabreicht werden. Herstellung und Dosierungspläne für solche chemotherapeutischen Mittel können gemäß den Anleitungen der Hersteller eingesetzt werden oder können gemäß Erfahrungswerten von Fachleuten bestimmt werden. Die Herstellung und Dosierungspläne für solche Chemotherapien sind auch in *Chemotherapy Service*, M.C. Perry (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992), beschrieben. Das chemotherapeutische Mittel kann vor oder nach der Verabreichung des Antagonisten zugeführt werden oder kann auch gleichzeitig damit verabreicht werden. Bei Krebsindikationen kann es wünschenswert sein, auch Antikörper gegen die mit dem Tumor assoziierten Antigene oder gegen angiogene Faktoren zu verabreichen, wie bei-

spielsweise Antikörper, die sich an HER2 oder den Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF) binden. Alternativ oder zusätzlich dazu können dem Patienten ein oder mehrere Cytokine parallel verabreicht werden.

**[0118]** Eine wirksame Menge an Antikörper, der therapeutisch eingesetzt werden soll, hängt beispielsweise von den therapeutischen Zielen, der Art der Verabreichung und dem Zustand des Patienten ab. Demgemäß wird es für den behandelnden Arzt erforderlich sein, je nach Bedarf die Dosierung zu titrieren und die Art der Verabreichung zu modifizieren, um maximale therapeutische Wirkung zu erzielen. Eine typische Dosierung könnte im Bereich von etwa 1 µg/kg bis zu 100 mg/kg, vorzugsweise von etwa 10 µg/kg bis 10 mg/kg, Patientenkörpergewicht liegen. Typischerweise wird der Arzt Antagonisten verabreichen, bis eine Dosierung erreicht ist, die die erwünschte Wirkung zur Behandlung der zuvor genannten Erkrankungen erzielt. Für C2B8 wird auf die Internationale Veröffentlichung Nr. WO 94/11026 und EP B 669.836 verwiesen, deren Offenbarung hierin durch Verweis aufgenommen sind.

**[0119]** Arten der Verabreichung für die einzelnen oder kombinierten therapeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen herkömmliche Arten, wie beispielsweise intravenöse Infusion oder Bolusinjektion.

**[0120]** Die Präparate der Erfindung können in einen Herstellungsartikel und in ein Set eingebunden sein, das Materialien enthält, die zur Behandlung von Krebs beispielsweise nützlich sind. Der Herstellungsartikel umfasst einen Behälter mit einer Markierung. Geeignete Behälter umfassen beispielsweise Flaschen, Phiole und Proberöhrchen. Die Behälter können aus einer Vielzahl an Materialien wie beispielsweise Glas oder Kunststoff gebildet werden. Der Behälter trägt eine Zusammensetzung, die die hierin beschriebenen Glykoproteinpräparate enthält. Der aktive Wirkstoff in der Zusammensetzung ist das bestimmte Glykoprotein wie beispielsweise C2B8. Die Markierung am Behälter gibt an, dass die Zusammensetzung zur Behandlung oder Prävention einer bestimmten Erkrankung oder eines bestimmten Leidens verwendet wird, und kann auch Anleitungen für In-vivo-Therapiebeispielsweise, wie zuvor erläutert, umfassen.

**[0121]** Das Set umfasst den zuvor beschriebenen Behälter und einen zweiten Behälter, der einen Puffer umfasst. Es kann weiters andere Materialien einbinden, die aus wirtschaftlicher Hinsicht und für den Benutzer wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Anleitungen für den Benutzer.

**[0122]** Die folgenden Beispiele sind als Veranschaulichung und nicht als Einschränkung bereitgestellt. Die Offenbarungen aller zitierten Quellen in der Beschreibung sind hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen.

#### BEISPIELE

##### BEISPIEL I

##### Einführung

**[0123]** Im Wesentlichen homogene Glykoproteinpräparate werden unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele hergestellt.

##### Verfahren

**[0124]** Der chimäre monoklonale Anti-CD20-Antikörper (IDEC-C2B8) wurde wie zuvor beschrieben (Liu et al., J. Immunol. 139, 3521 (1987); Maloney et al., Blood 84, 2457 (1994)) hergestellt. Andere IgG-Moleküle, wie beispielsweise Anti-HER2 (Anti-P185<sup>HER2</sup>, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992)), Anti-VEGF (Kim et al., Growth Factors 7, 53-64 (1992)), Anti-IgE (Presta et al., J. Immunol. 151, 2623 (1993)) und TNFR-IgG (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-IgG; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10535 (1991)) wurden durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt und in CHO-Zellen exprimiert. b-1,4-Galactosyltransferasen aus menschlichen Quellen und Quellen von Rindern stammten von Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) bzw. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). UDP-Gal wurde bei Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) erhalten. Penicillin, Streptomycin, Glutamin, HEPES, lyophilisiertes Kaninchenserum und menschliches Serum, die als Komplementquelle verwendet wurden, wurden bei GIBCO-BRL (Grand Island, NY) erworben. Fötales Rinderserum wurde bei Hyclone Laboratories (Logan, UT) erworben. Rinderserumalbumin (RSA) und Trypanblau wurden bei Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) erworben. Alamar-Blue-Reagens stammt von Accumed International (Westlake, OH). NAP-5 und Protein-A-Sepharose-Säulen wurden bei Pharmacia (Schweden) erworben. Natriumcyanoborhydrid in Tetrahydrofuran stammte von Aldrich Chemical Co.

## IDEC-C2B8

**[0125]** IDEC-C2B8 wurde zu 10 mg/ml in 25 mM Natriumcitrat, 150 mM Natriumchlorid und 0,07 mg/ml Polysorbat 80 bei einem pH von 6,5 formuliert.

## Beispiel II

## GALACTOSYLIERUNG MIT GALACTOSYLTRANSFERASE

**[0126]** Die Antikörper-Proben (IDEC-C2B8, Anti-HER2, Anti-VEGF, Anti-IgE und TNFR-IgG), 10 mg in 0,5 ml, wurden in 50 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,1 (Endvolumen 1,0 ml) puffergetauscht. 50 µl jeweils von 100 mM UDP-Gal und 100 mM MnCl<sub>2</sub> wurden der Antikörperlösung zugesetzt. Die b1,4-Galactosyltransferase (b1,4GT; gefriergetrocknetes Pulver) wurde in 50 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,1, in einer Konzentration von 1 mU/ml wieder hergestellt. 50 µl dieser Lösung wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt und bei 37 °C 48 Stunden lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Abkühlen der Reaktionsphiole auf Eisbad (4 °C) gestoppt, und der galactosylierte Antikörper wurde an einer Protein-A-Säule gereinigt.

## Beispiel III

## REINIGUNG VON GALACTOSYLIERTEM ANTIKÖRPER AN PROTEIN-A-SÄULE

**[0127]** Das Reaktionsgemisch, das den galactosylierten Antikörper enthielt, wurde auf eine Protein-A-Sepharosesäule (5 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit zumindest 5 Säulenvolumina von phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,0) gewaschen, und der gebundene Antikörper wurde mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,0, eluiert, wobei das Reaktionsgemisch sofort auf pH 6,5 durch Zusatz von 500 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, eingestellt wurde.

## Analyse der N-gebundenen Oligosaccharide

## Freisetzung und Markieren von N-gebundenen Oligosacchariden

**[0128]** Proteinproben (500-1.000 µg) wurden in 20 mM Natriumphosphatpuffer, der 50 mM EDTA und 0,02 % (Gew./Vol.) Natriumazid enthielt, pH 7,5, unter Verwendung von NAP-5-Säulen (Pharmacia) puffergetauscht. Fünf bis zehn Einheiten rekombinanter Peptid-N-Glykosidase F (Oxford Glycosystems/Boehringer Mannheim) wurden den Proben zugesetzt und 15 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Das deglykosylierte Protein wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C gefällt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 × g entfernt. Der Überstand, der die freigesetzten Oligosaccharide enthielt, wurde in einem Zentrifugalvakuumverdampfer getrocknet und durch Zusatz von 15 µl von 1,9 mM Lösung von 9-Aminopyren-1,4,6-trisulfonat (APTS, Beckmann) in 15 % Essigsäure und 5 µl von 1 M Natriumcyanoborhydrid in Tetrahydrofuran markiert. Die Markierungsreaktion wurde 2 Stunden lang bei 55 °C durchgeführt, in Wasser verdünnt (0,5 ml) und durch Kapillarelektrophorese (CE) analysiert.

## Beispiel IV

## Analyse durch Kapillarelektrophorese

**[0129]** CE-Analyse der markierten Oligosaccharide wurde an einem P/ACE-5000-CE-System (Beckman) mit umgekehrter Polarität unter Verwendung einer beschichteten Kapillare mit 50 mm Innendurchmesser und 20 cm effektiver Länge (eCAP, N-CHO-beschichtete Kapillare, Beckmann) durchgeführt. Die Proben wurden durch Druckinjektion bei 0,5 psi 8 Sekunden lang eingeführt, und Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 740 V/cm. Die Temperatur der Kapillare wurde bei 20 °C gehalten. Die Trennungen wurden an der Säule mittels eines Laser-induzierten Fluoreszenzdetektionssystems von Beckmann unter Verwendung eines 3-mW-Argonionen-Lasers mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und eines Emissions-Bandfilters von 520 × 10 nm beobachtet.

## Ergebnisse

**[0130]** **Fig. 1A** und **Fig. 1B** zeigen Oligosaccharidanalyse eines monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers C2B8 durch Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion. In **Fig. 1A** produzierte C2B8, das in Chargen-befüllter 400-I-Kultur produziert wurde, zumindest drei Glykoformen von C2B8. **Fig. 1B** zeigt dassel-

be C2B8-Präparat, das mit  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt wurde. Ein einziges G2-Glykoformpräparat wurde erhalten.

[0131] **Fig. 2** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpers mittels Kapillarelektrophorese. Aus **Fig. 2** ist ersichtlich, dass Anti-VEGF, das in CHO-Zellkultur hergestellt worden war, zumindest drei Glykoformen produzierte, die eine heterogene Zusammensetzung bildeten. Dasselbe Anti-VEGF, das mit  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt wurde, produzierte eine einzige G2-Glykoform.

[0132] **Fig. 3** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers mittels Kapillarelektrophorese. Aus **Fig. 3** ist ersichtlich, dass Anti-IgE, das in CHO-Zellkultur hergestellt worden war, zumindest drei Glykoformen produzierte, die eine heterogene Oligosaccharid-Population bildeten. Dieselben Anti-IgE-CHO-Zellzusammensetzung, die mit  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt wurde, produzierte eine einzige G2-Glykoform.

[0133] **Fig. 4** zeigt die Analyse eines monoklonalen Anti-HER2-Antikörpers mittels Kapillarelektrophorese. Aus **Fig. 4** ist ersichtlich, dass Anti-HER2, das in CHO-Zellkultur hergestellt worden war, zumindest drei Glykoformen produzierte, die eine heterogene Oligosaccharid-Population bildeten. Dieselben Anti-HER2-CHO-Zusammensetzung, die mit  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt wurde, produzierte eine einzige G2-Glykoform.

#### Beispiel V

##### NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

[0134] Proteinproben wurden auf 1,0 mg/ml in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verdünnt. Die Proben wurden auf 0,2 mg/ml im Fall der silbergefärbten Gele und auf 0,5 mg/ml im Fall der Immunoblots in Probenpuffer verdünnt und 3 min lang bei 90 °C erhitzt. Bei reduzierten Proben enthielt der Probenpuffer 80 mM DTT. Proben (10  $\mu$ l) wurden mit einem 4- bis 20%igen Acrylamidgradienten auf MiniPlus-Septagele von Integrated Separation Systems (ISS) geladen. Elektrophorese erfolgte unter Verwendung der ISS-Mini-2-Gel-Vorrichtung bei 30 mA pro Gel 60 Minuten lang. Novex-Mark12-Molekulargewichtstandards wurden für die silbergefärbten Gele verwendet, während Amersham-Rainbow-Molekulargewichtstandards für die mittels Immunoblotting vorbereiteten Gele eingesetzt wurden.

#### Silberfärbung

[0135] SDS-PAGE-Gele wurden über Nacht in einer fixierenden Lösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) inkubiert, in Wasser gewaschen und in Inkubationslösung (30 % Ethanol, 25 % Glutaraldehyd, 0,5 M Natriumacetat, 10 mM Natriumthiosulfat) inkubiert. Die Gele wurden neuerlich gewaschen und 40 min lang in Silbernitratlösung (6 mM Silbernitrat, 0,01 % Formaldehyd) inkubiert, gewaschen und mit zwei Änderungen der Entwicklungslösung (0,3 M Natriumcarbonat, 0,01 % Formaldehyd) entwickelt. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Inkubieren in Stopplösung (40 mM EDTA) gestoppt und vor dem Scannen gewaschen.

[0136] **Fig. 5** zeigt eine repräsentative SDS-Polyacrylamidgel-Analyse eines monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Bahn 1 sind Molekulargewichtsstandards, Bahn 2 ist die G2-Glykoform von C2B8; Bahn 3 ist das C2B8-Präparat, das mit Galactosidase behandelt wurde, um Galactosereste aus den Oligosacchariden zu entfernen; Bahn 4 ist das aus CHO abstammende C2B8-Präparat, behandelt mit PNGase-F zur Entfernung von intaktem Oligosaccharid; Bahn 5 ist der C2B8-Antikörper aus CHO-Herstellung; Bahn 6 ist das von CHO abstammende C2B8 nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C; Bahn 7 ist das von CHO abstammende C2B8 und BSA. Das repräsentative Gel zeigt, dass das gesamte C2B8-Molekül nach Behandlung mit der Galactosyltransferase intakt bleibt. Die G2-Glykoform schließt die Primärstruktur des Antikörpers nicht auf.

[0137] **Fig. 6** zeigt dasselbe Material wie oben beschrieben, das mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert wurde. Die C2B8-Schwer- und -Leichtketten blieben intakt.

## Beispiel VI

## ELEKTROTRANSFER UND IMMUNFÄRBUNG

**[0138]** Nach SDS-PAGE wurde das Protein auf Nitrocellulose (0,2 m, Schleicher & Schuell) in einer NovaBlot-Semi-Dry-Elektrotransfer-Vorrichtung in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM TRIS, 0,04 % SDS, 20 % Methanol) 90 Minuten lang bei 10 V elektrotransferiert. Nach dem Elektrotransfer wurden die Nitrocellulose-Blätter in Gelatinepuffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 4,3 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100 und 0,25 % Fischgelatine) blockiert. Die Immunoblots wurden mit einem affinitätsgereinigten Ziege-Anti-Mensch-IgG (Jackson Laboratories) oder Ziege-Anti-CHOP (IDEC Pharmaceuticals) sondiert. Nach Inkubation mit den primären Antisera wurden die Nitrocellulose-Blätter mit Gelatinepuffer gewaschen und anschließend 90 Minuten lang mit einem Kaninchen-Anti-Ziege-IgG-HRP (Jackson-ImmunoResearch) inkubiert. Die Immunoblots wurden mit Gelatinepuffer und dann PBS/Tween 20 gewaschen. Die Immunoblots wurden mit der Substratlösung gefärbt; 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat (DAB), 0,5 mg/ml, Nickelammoniumsulfat, 0,3 mg/ml; Cobaltdichlorid, 0,3 mg/ml in PBS mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Beispiel VII

## ZIRKULARDICHROISMUSSPEKTRUM

**[0139]** Das Zirkulardichroismusspektrum von GT-behandeltem und unbehandeltem C2B8 wurde an einem AVIV-60DS-Spektralpolarimeter erhalten. Jede Probe wurde gegen 25 mM Natriumcitrat und 150 mM Natriumchlorid dialysiert und dann in eine thermostatisierte 0,01-cm-Kreisküvette pipettiert. Jedes Spektrum war die Summe von 5 Scans von 200 bis 250 nm. Die Spektren wurden bei 20 °C erhalten. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung eines  $A^{0,1\%} = 1,7 \text{ cm}^{-1}$  bei 280 nm bestimmt. Die mittlere Rückstandsgewicht-Elliptizität wurde aus

$$[Q]_{MRW} = Q_{obs} \cdot (MRW)/10 \text{ c l}$$

berechnet, worin  $Q_{obs}$  die Elliptizität der Probe ist, MRW das mittlere Rückstandsgewicht des IDEC-C2B8 (108,8) ist, c die Probenkonzentration in mg/ml ist und l die Weglänge der Zelle in cm ist. Der Gehalt der sekundärstrukturellen Elemente,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und nicht geordnete Strukturen wurde unter Verwendung des Programms CONTIN (Provencer & Glockner, Biochem. 20, 33-37 (1981); Provencer, Comput. Phys. Commun. 27, 229-242 (1982)) berechnet.

**[0140]** Die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) zeigen Nah- und Fern-UV-CD-Spektren von C2B8-Antikörper aus CHO-Kultur und der G2-Glykoform. Wie aus dieser Analyse geschlossen werden kann, ist die durch Zirkulardichroismus als eine Indikation für Sekundärstruktur (Provencher & Glockner, Biochem. 20, 33-37 (1981)) untersuchte G2-Glykoform dieselbe wie die heterogene C2B8-Zusammensetzung.

## Beispiel VIII

## KULTIVIEREN VON WIL2-S-ZELLEN:

**[0141]** Die menschliche B-Lymphoblastoid-Zelllinie WIL2-S wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) erhalten. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, ergänzt mit 10 % Hitze-deaktiviertem (56 °C, 30 min) fötalem Rinderserum, 2 mM Glutamin und 20 mM HEPES, pH 7,2, gezüchtet. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem befeuchteten 5%-CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

## KOMPLEMENT-ABHÄNGIGER ZYTOTOXIZITÄT-BIOTEST:

**[0142]** Der CDC-Biotest für C2B8-Proben wurde unter Verwendung von RHBP (RPMI-1640, ergänzt mit 0,1 % BSA, 20 mM HEPES (pH 7,2-7,4)), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin durchgeführt. Für den Test wurden 50 µl von 10<sup>6</sup> Zellen/ml Zellsuspension, 50 µl verschiedener Konzentrationen von C2B8 und 50 ml einer 1/5-Kaninchenkomplement- oder menschlichen Komplementverdünnung zu 96-Well-Gewebekulturplatten mit flachem Boden zugesetzt und 2 h lang bei 37 °C und 5 CO<sub>2</sub> inkubiert, um komplementvermittelte Zelllyse zu erleichtern. 50 µl AlamarBlue (unverdünnt, gesetzlich geschützte Formulierung von Accumed International) wurden dann zugesetzt und die Inkubation weitere 5 h fortgesetzt. Die Platten wurden auf Raumtemperatur 10 min lang auf einem Schüttler abkühlen gelassen, und die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines 96-Well-Fluorimeters mit Anregung bei 530 nm und Emission bei 590 nm abgelesen. Die Resultate sind in

relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) ausgedrückt. RFU wurden gegen C2B8-Konzentrationen unter Verwendung eines 4-Parameter-Kurvenanpassungs-Programms (kaleidaGraph) geplottet, und die Probenkonzentrationen wurden aus der Standardkurve berechnet. Alle C2B8-Konzentrationen, die im Rahmen dieses Berichts gezeigt werden, beziehen sich auf Endkonzentrationen in den Wells vor dem Zusatz von AlamarBlue (Gazzano-Santoro, J. Immunol. Methl. 202, 163-171 (1997)).

**[0143]** [Fig. 8](#) zeigt die Bioaktivität des G2-Glykoformpräparats im Vergleich mit der heterogenen Zusammensetzung für C2B8 in einem Kaninchenkomplement-Lysetest.

**[0144]** [Fig. 9](#) zeigt die Korrelation von Bioaktivität und Galactosegehalt in der G2-Glykoform. Das G2-Glykoformpräparat war in diesem Test zumindest 1,5-mal aktiver als jenes, das unter typischen Zellkulturbedingungen produziert wurde.

### Patentansprüche

1. Im Wesentlichen homogenes Glykoproteinpräparat, worin im Wesentlichen alle Glykoproteinmoleküle des Präparats als G2-Glykoform vorliegen, die eine Immunglobulin-CH2-Domäne umfasst, worin die CH2-Domäne zumindest ein N-gebundenes Oligosaccharid aufweist, worin die Menge an aus unerwünschten Glykoformen entstandenen Nebenprodukten 10 Gew.-% nicht übersteigt.

2. Präparat nach Anspruch 1, worin die Menge an aus unerwünschten Glykoformen entstandenen Nebenprodukten weniger als 5 Gew.-% beträgt.

3. Präparat nach Anspruch 2, worin die Menge an aus unerwünschten Glykoformen entstandenen Nebenprodukten weniger als 1 Gew.-% beträgt.

4. Präparat nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das N-gebundene Oligosaccharid ein halbierendes N-Acetylglucosamin umfasst.

5. Präparat nach Anspruch 4, worin das Glykoprotein ein Antikörper ist.

6. Präparat nach Anspruch 5, worin der Antikörper ein chimärer Antikörper oder ein humanisierter Antikörper ist.

7. Präparat nach Anspruch 5, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

8. Präparat nach Anspruch 7, worin der Antikörper ein IgG ist.

9. Präparat nach Anspruch 8, worin das IgG menschliches IgG ist.

10. Präparat nach Anspruch 9, worin der monoklonale Antikörper aus der aus Anti-CD20-spezifischen monoklonalen Antikörpern, Anti-HER2-spezifischen monoklonalen Antikörpern, Anti-VEGF-spezifischen monoklonalen Antikörpern und Anti-IgE-spezifischen monoklonalen Antikörpern bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Glykoprotein ein Immunadhäsion ist.

12. Präparat nach Anspruch 11, worin das Immunadhäsion eine Tumornekrosefaktor-Immunglobulin-G1-Chimäre ist.

13. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Glykoprotein eine Antikörper-Immunadhäsion-Chimäre ist.

14. Verfahren zur Herstellung des Präparats nach einem der vorangehenden Ansprüche, umfassend die Schritte des Umsetzens:

a) eines Metallsalzes in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 25 mM;

b) einer aktivierten Galactose in einer Konzentration von etwa 5 mM bis etwa 50 mM;

c) einer Galactosyltransferase in einer Konzentration von etwa 1 mU/ml bis etwa 100 mU/ml;

d) eines Substrat-Glykoproteins;

in einer wässrigen, gepufferten Lösung bei einer Temperatur von etwa 25 bis 40 °C und des Gewinnens des Glykoproteins.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Metallsalz aus der aus  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, worin die aktivierte Galactose Uridindiphosphatgalactose (UDP-Galactose) ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, worin die Galactosyltransferase eine Säuger- $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase ist.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 14 bis 17, worin die Reaktionstemperatur etwa  $37^{\circ}C$  beträgt, das Metallsalz  $Mn^{2+}$  in einer Konzentration von etwa 5 mM ist, die UDP-Galactose-Konzentration etwa 5 mM und die  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase-Konzentration etwa 1 mU/ml beträgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, worin das Glykoprotein ein Immunadhäsion ist, das ein bispezifisches Immunadhäsion ist.
20. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Erkrankungszustands.
21. Präparat nach Anspruch 20, worin der Erkrankungszustand aus der aus Entzündungserkrankungen, Krebs, neurologischen Erkrankungen und Herzerkrankungen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
22. Präparat nach Anspruch 21, worin der Erkrankungszustand aus der aus Neurofibromatose, peripheren Neuropathologien und Herzhypertrophie bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
23. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend das Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
24. Verwendung des Präparats nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Erkrankungszustandes, der aus der aus Entzündungserkrankungen, Krebs, neurologischen Erkrankungen und Herzerkrankungen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
25. Verwendung nach Anspruch 24, worin der Erkrankungszustand aus der aus Neurofibromatose, peripheren Neuropathologien und Herzhypertrophie bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

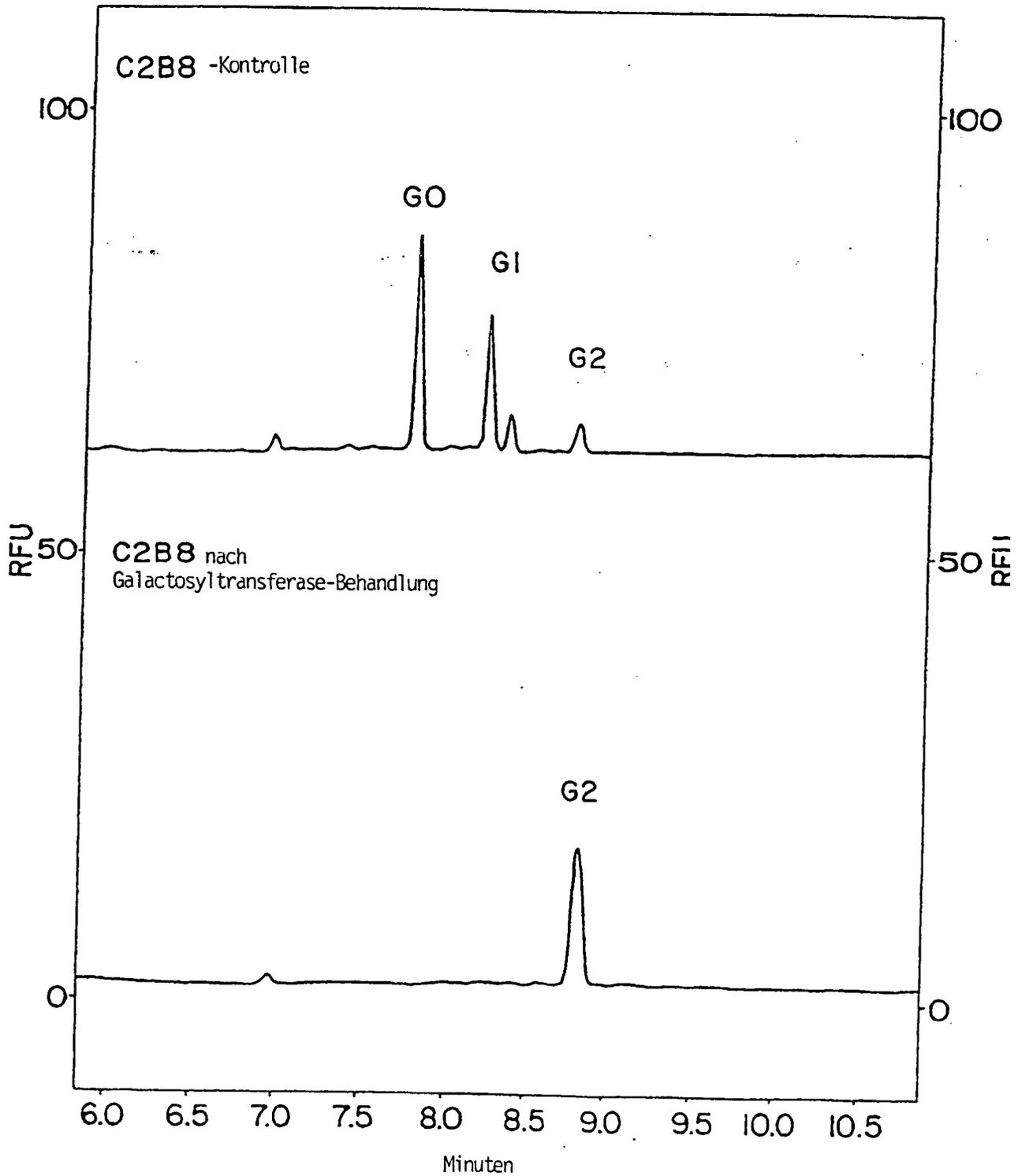


FIG. 1

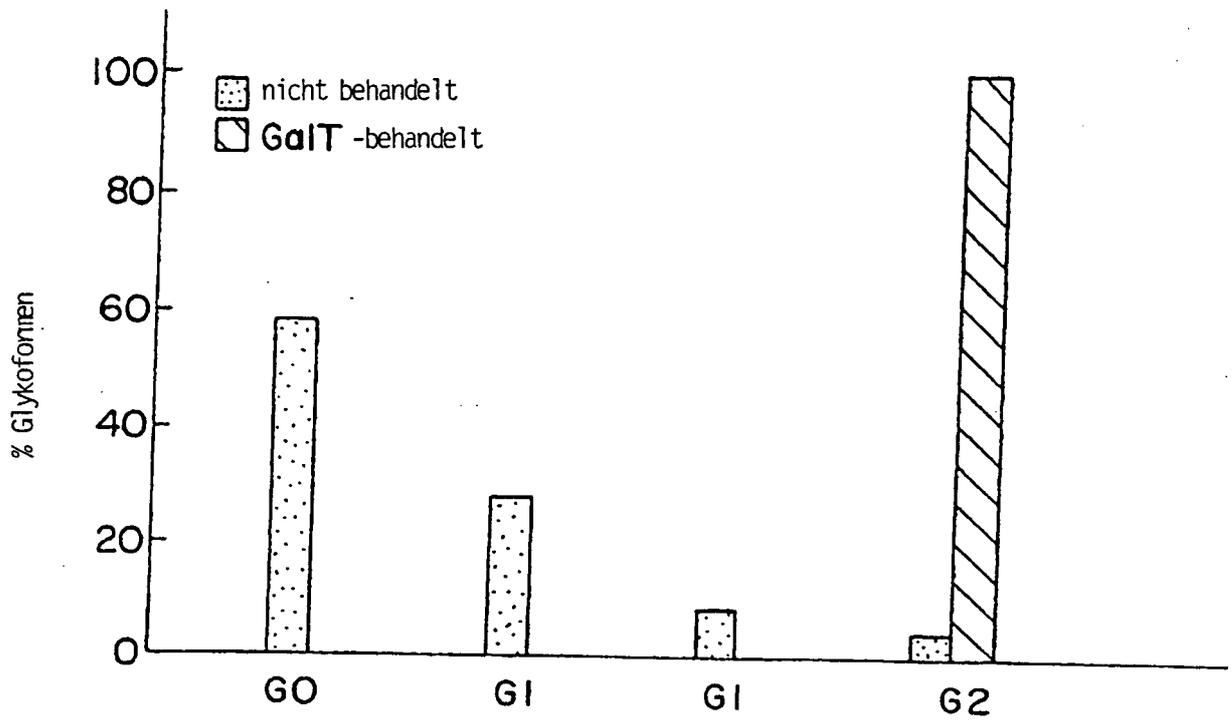


FIG. 2

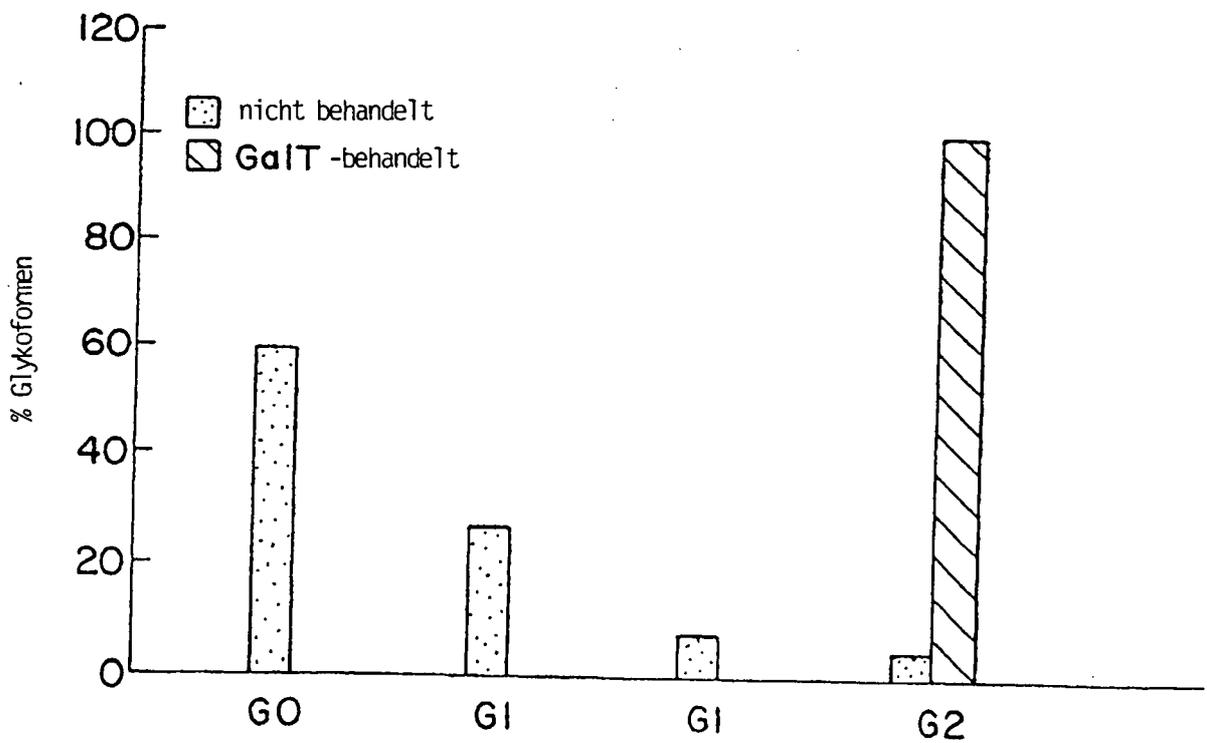


FIG. 3

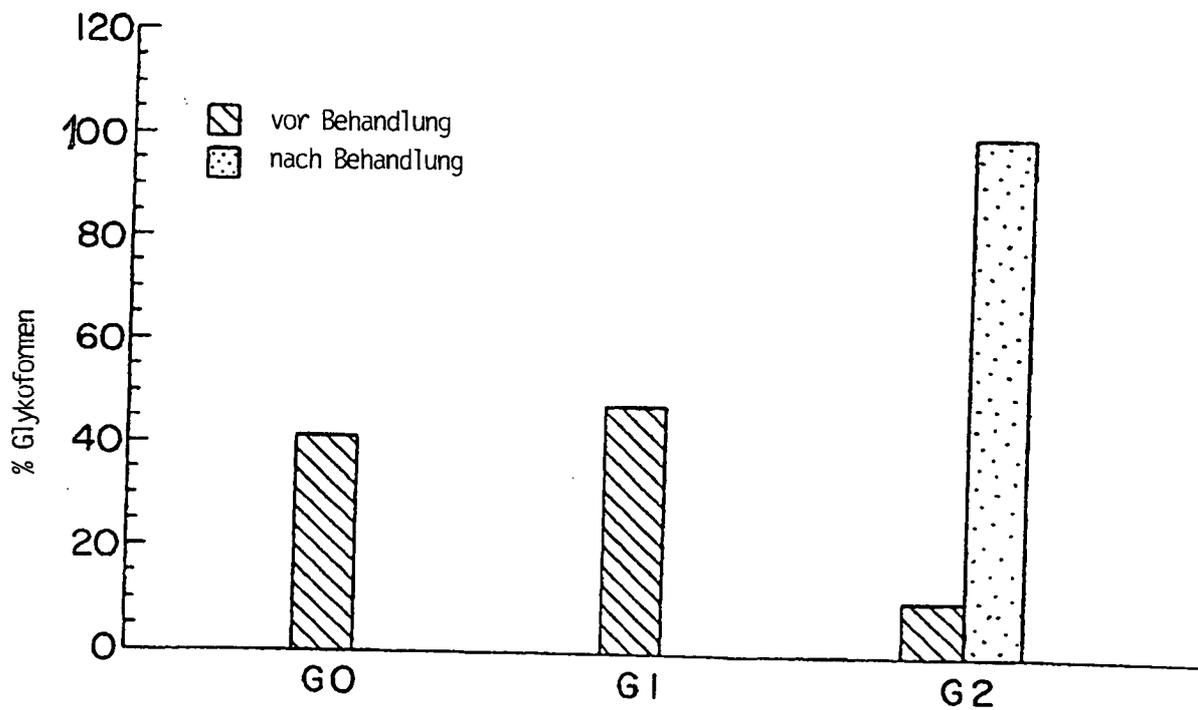
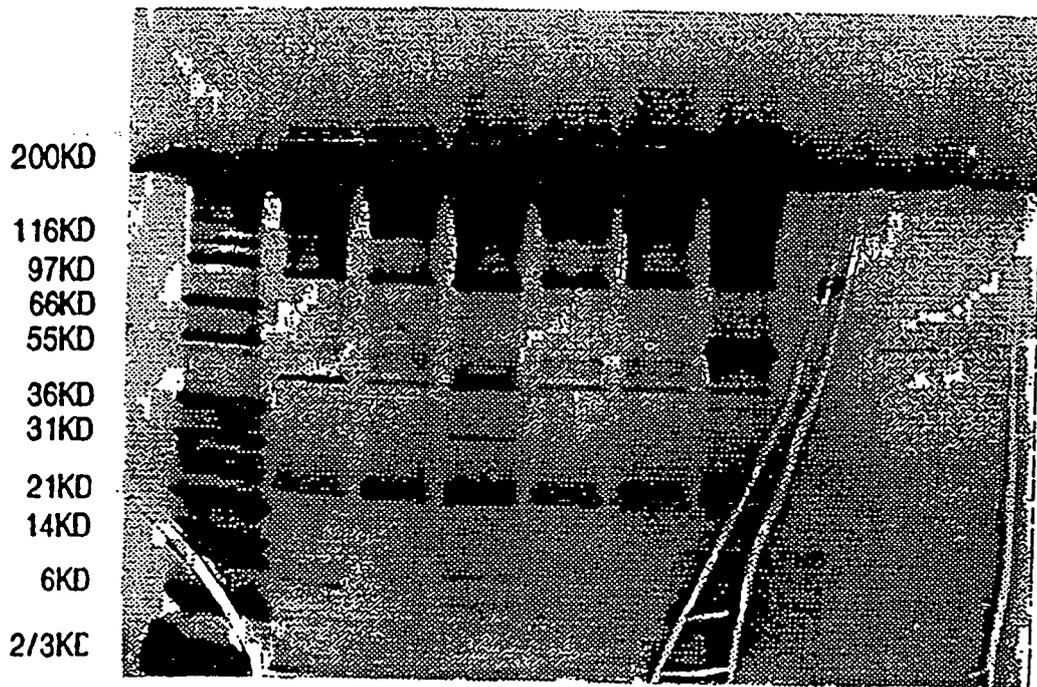


FIG. 4



NOVEX MARK 12

G<sub>2</sub>-MATERIAL

G<sub>0</sub>-MATERIAL

PNGasE-BEHANDELT

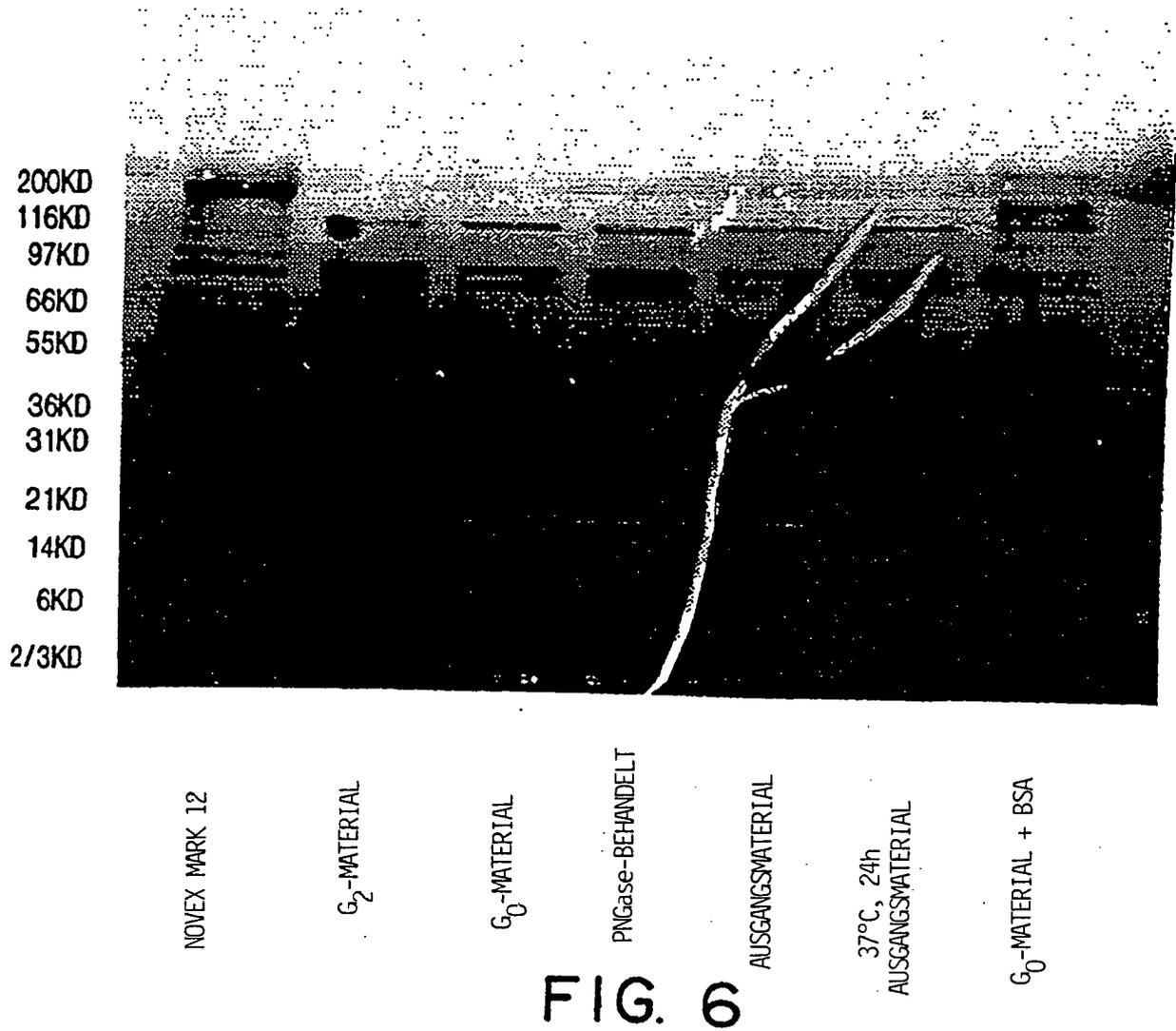
AUSGANGSMATERIAL

37°C, 24h

AUSGANGSMATERIAL

G<sub>0</sub>-MATERIAL + BSA

FIG. 5



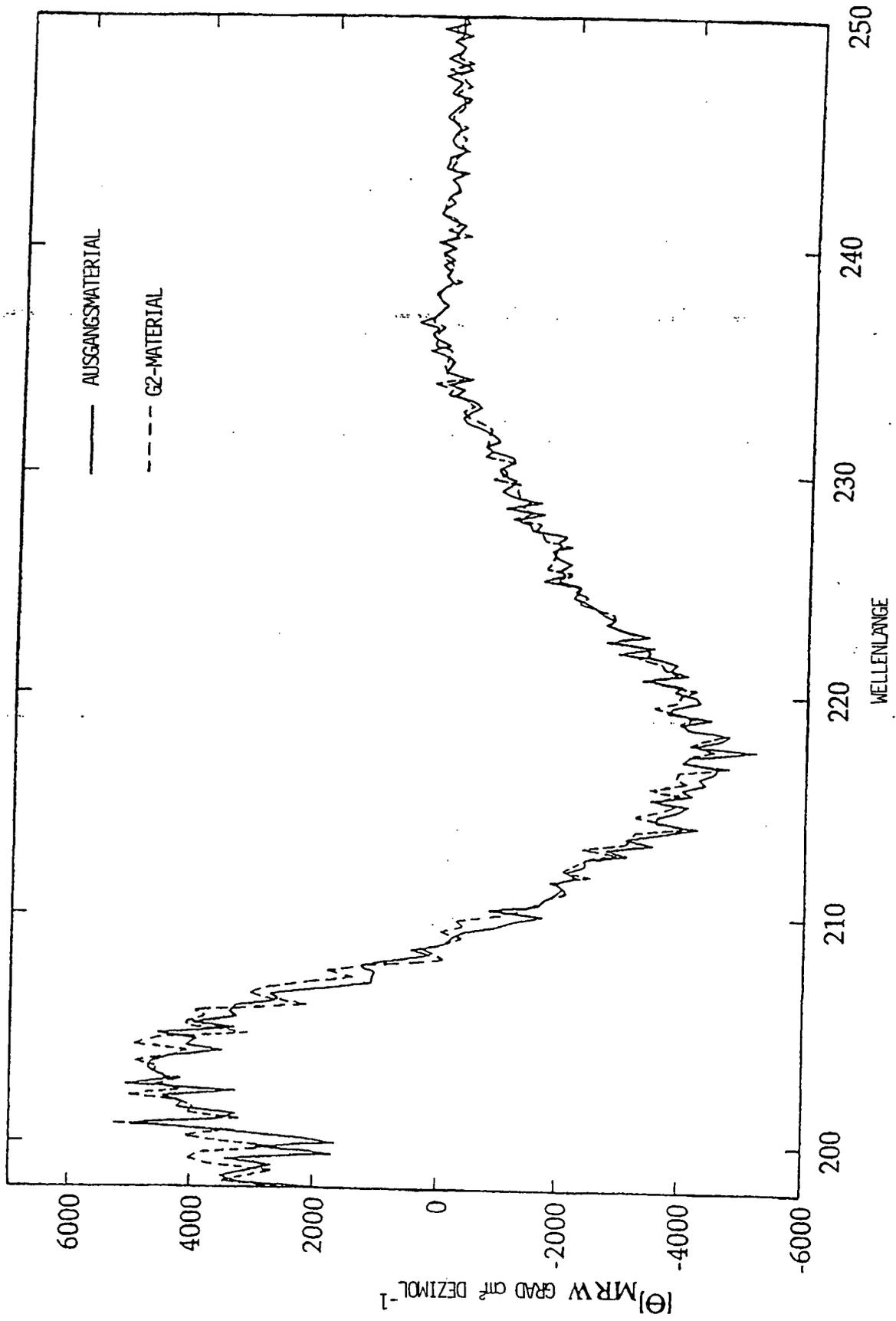


FIG. 7A

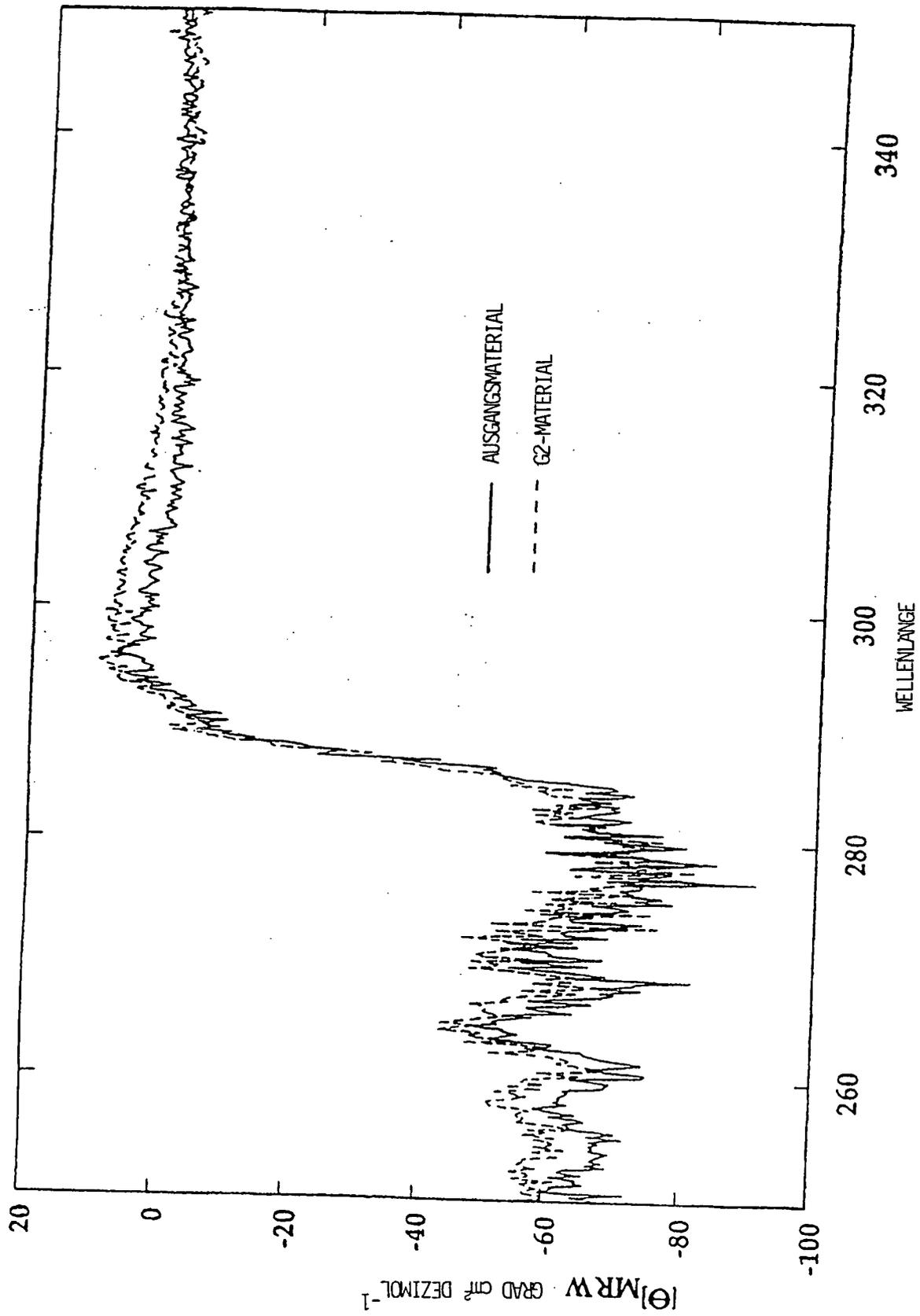


FIG. 7B

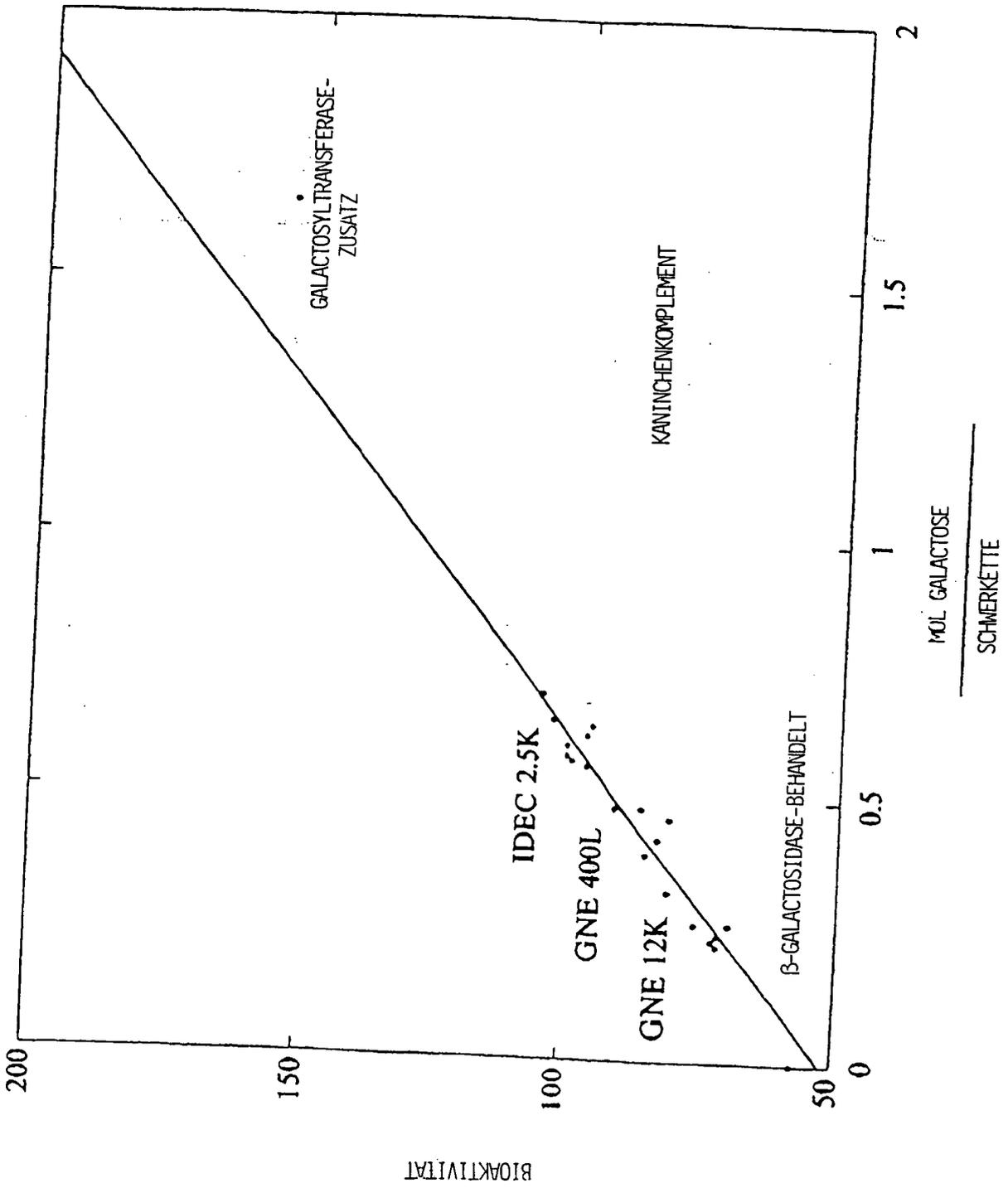


FIG 8

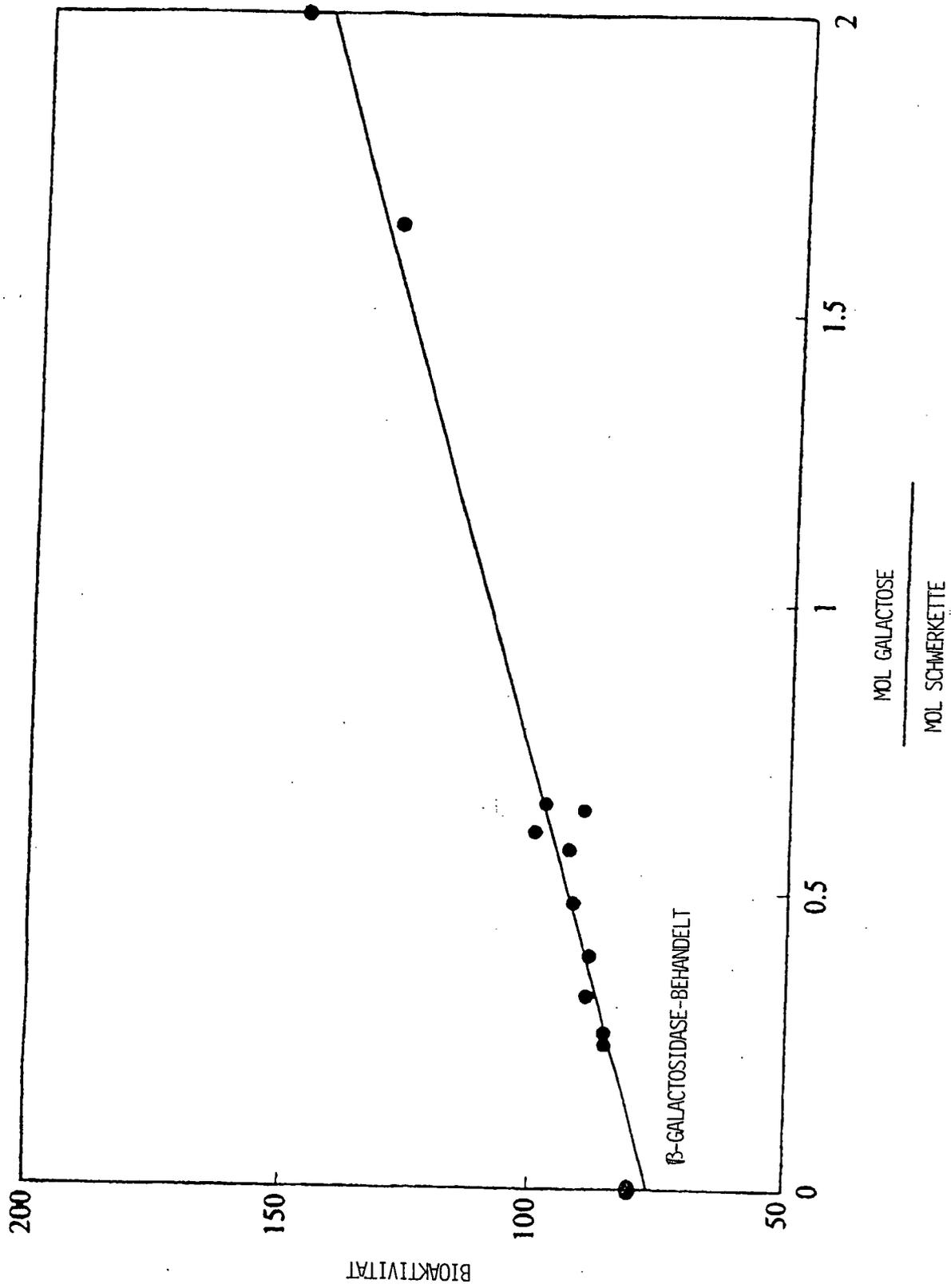


FIG. 9