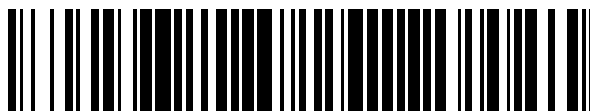


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 017**

51 Int. Cl.:
C07K 16/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08864164 .2**
96 Fecha de presentación: **18.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2225273**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

54 Título: **Ensayo de estabilidad de anticuerpos**

30 Prioridad:
21.12.2007 EP 07024863

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.10.2012

73 Titular/es:
**ROCHE GLYCART AG
WAGISTRASSE 18
8952 SCHLIEREN-ZUERICH, CH**

72 Inventor/es:
**ESER, Bianca;
KOLL, Hans;
REGULA, Joerg Thomas y
SONDERMANN, Peter**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 017 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de estabilidad de anticuerpos.

5 Información de los antecedentes

En los últimos años, el campo de la industria farmacéutica ha tenido mucho éxito con los productos basados en, entre otros, enzimas, anticuerpos y citocinas tales como, por ejemplo la eritropoyetina, los interferones y los activadores del plasminógeno. La demanda mundial de agentes terapéuticos proteicos aumenta cada año. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs, anticuerpos monoclonales) son un grupo importante dentro de las proteínas terapéuticas. Se conocen como monoclonales debido a que, a diferencia de los anticuerpos policlonales, se secretan por células inmunológicas (clones celulares) que derivan de una única célula formadora de anticuerpos. Una característica de los anticuerpos monoclonales es que cada uno de ellos está dirigido únicamente contra un epítipo de una sustancia inmunogénica y, por tanto, únicamente contra un determinante antigénico y, por consiguiente, puede utilizarse específicamente en el tratamiento de enfermedades. Algunos ejemplos de proteínas terapéuticas son los anticuerpos monoclonales Trastuzumab (nombre comercial: Herceptin), Daclizumab (nombre comercial: Zenapax) y Rituximab (nombre comercial: MabThera) de Roche Diagnostics GmbH Company, que se han utilizado satisfactoriamente en el tratamiento del cáncer de mama (Trastuzumab), el rechazo de un órgano (Daclizumab) y para tratar el linfoma no Hodgkin (Rituximab), entre otros.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se obtienen mediante procesos biotecnológicos complejos. Se pueden formar productos de degradación durante su producción, formulación y almacenamiento, lo que a menudo lleva a procesos como las reacciones de oxidación y desamidación, así como a escisiones proteolíticas (Yan, B., et al., J. Chromatog. A 1164 (2007) 153-161). Las modificaciones de los productos biológicos pueden dar como resultado un cambio en la actividad y/o inmunogenicidad debido a los cambios estructurales en la molécula, incluso cuando estos ocurren sólo en pequeña medida.

Además de su acción, la calidad de un producto biofarmacéutico es de una importancia decisiva. Consecuentemente, de manera adicional a la investigación detallada de los modos de acción, es absolutamente esencial determinar la identidad, pureza y actividad de un fármaco basado en proteínas, con tal de que se pueda utilizar de forma segura como agente terapéutico.

Aunque los mAb pueden analizarse satisfactoriamente mediante varias técnicas de separación y de ensayo, durante mucho tiempo ha sido difícil la aplicación y optimización de los métodos de RP-HPLC (RP-HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa) para separar las especies de anticuerpos. No obstante, durante el curso de un proceso de degradación se presentan simultáneamente varias modificaciones del anticuerpo, lo que hace más difícil el análisis de las diversas bandas cromatográficas y electroforéticas. El análisis mediante los métodos de separación por cromatografía líquida acoplados a los espectrómetros de masas de alta resolución (LC/MS, cromatografía líquida/espectrometría de masas) proporciona información sobre la masa exacta de varias especies y, por consiguiente, facilita la identificación de las variantes del anticuerpo (Dillon, T.M., et al., J. Chromatogr. A, 1053 (2004) 299-305).

La endoproteasa de cisteína IdeS (enzima S que degrada la inmunoglobulina) del patógeno humano *Streptococcus pyogenes*, también conocida como Mac-1 o sib-38, es una proteasa de cisteína que escinde específicamente la cadena pesada de anticuerpos del tipo de inmunoglobulina G (IgG). Hasta la fecha, la IgG es el único sustrato conocido de la IdeS (Vincents, B., et al., *Biochem.* 43 (2004) 15540-15549). La IdeS consiste en 339 aminoácidos que incluyen un péptido señal de 29 aminoácidos (von Pawel-Rammigen, U., et al., *EMBO J.* 21 (2002) 1607-1615) donde se forma un motivo RGD en los aminoácidos 214-216. La IdeS escinde la IgG humana (inmunoglobulina de clase G) entre los aminoácidos 236 y 237 (Gly-Gly) que se encuentran en la secuencia de reconocimiento LLGGP. La IgG2 humana se escinde entre los aminoácidos alanina y glicina en el motivo de reconocimiento PVAGP. Los anticuerpos murinos de los tipos IgG2a e IgG3 también se escinden (Vincents, B., et al., *Biochem.* 43 (2004) 15540-15549).

Hess, J.K., et al. (Hess, J.K., et al., *J. Microbiol. Meth.* 70 (2007) 284-291) describen un método de espectrometría de masas para la determinación de la actividad enzimática de IdeS con la ayuda de la espectrometría de masas SELDI-TOF. En la patente US 2007/0237784 se describe un polipéptido que se aisló en *S. pyogenes* y que presenta actividad proteasa de cisteína IgG. En la solicitud de patente europea EP 1 458 861 se describe un método para la formación de fragmentos Fc o Fab de anticuerpos. La proteasa IdeS del grupo A de los estreptococos se describe en la patente WO 2006/131347.

Shantha Raju, T. y Scallon, B.J. describen en *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 797-803 que la glicosilación del dominio Fc de la IgG aumenta la resistencia frente a la escisión con papaína. Beck, A. et al. (*J. Chrom. B* 819 (2005) 2303-218) describen la caracterización mediante la cromatografía líquida en combinación con la espectrometría de masas de anticuerpos monoclonales anti-receptor de IGF-1 producidos en las células CHO y NS0. Loo, T., et al. (*Prot. Expr. Purif.* 24 (2002) 90-98) describen la utilización de la secreción para solventar un problema de solubilidad: la expresión de alto rendimiento en *Escherichia coli* y la purificación de la glucoamidas

PNGasa F bacteriana.

Resumen de la invención

5 La presente invención describe un método para la detección de anticuerpos IgG y fragmentos de anticuerpo IgG o formas modificadas de un anticuerpo IgG en una muestra, caracterizado de tal manera que incluye los siguientes pasos:

10 a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo IgG y/o sus productos de escisión,

b) incubar la muestra proporcionada según a) con

i) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG,

15 ii) N-glucosidasa F,

iii) el agente reductor tricloroetilfosfato y ácido fórmico

20 donde la incubación en los pasos b)-i), b)-ii) y b)-iii) es secuencial,

c) analizar la muestra incubada según b) mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas para detectar el anticuerpo intacto y para detectar fragmentos o formas modificadas del anticuerpo contenidas en la solución que se proporciona según a).

25 En una realización del método la proteasa de cisteína IdeS deriva de *Streptococcus pyogenes* o *Treponema denticola*. En una realización adicional la proteasa de cisteína específica para IgG tiene la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°:1. Otra realización incluye la incubación con una proteasa de cisteína específica para IgG en el intervalo de pH de 5,5 a 8,5. En otra realización el intervalo de pH es de entre 7,0 y 8,0 y, en una realización
30 adicional, entre 7,5 y 8,0. Aún en otra realización adicional, la proporción molar entre la proteasa de cisteína específica para IgG y el anticuerpo y/o los fragmentos de anticuerpo contenidos en la muestra es de entre 1:25 y 1:2500, preferiblemente entre 1:25 y 1:100.

Otra realización se caracteriza porque la N-glucosidasa F deriva de *Flavobacterium meningosepticum* (EC 3.2.2.18, EC 3.5.1.52). En otra realización, se trata de la glucosidasa Endo H y se utiliza a un pH entre 6,0 y 6,5. En otra
35 realización, la glucosidasa tiene la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°:2. Otra realización es en la que se añade el agente reductor simultáneamente con el ácido fórmico y la incubación se lleva a cabo en presencia de ambos agentes. Una realización adicional es aquella en la que la incubación con el agente de reducción se lleva a cabo a una temperatura de 60°C o más. En una realización adicional, la espectrometría de masas es una espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electropulverización (ESI-TOF). Aún en una
40 realización adicional, la cromatografía líquida es una cromatografía de interacción hidrofóbica o una cromatografía de interacción π - π . En el caso de una cromatografía de interacción hidrofóbica, el ligando de la cromatografía en otra realización es un ligando C8 o C18 unido a un material de cromatografía que tiene un tamaño de poro de 300 \AA . En una realización adicional, se utiliza o bien una columna Júpiter C18 o una columna Zorbax 300SB C8 o bien una
45 columna Pursuit de difenilo para la cromatografía líquida. Se utiliza una columna Pursuit de difenilo en otra realización. En una realización adicional, la cromatografía líquida en el paso c) es una cromatografía de fase reversa. Otro aspecto de la invención es un método para la detección de formas modificadas de un anticuerpo en el que el paso c) es el análisis de la muestra incubada según b) mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica.

50 Además, la invención incluye la utilización de la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG para la detección de anticuerpos IgG o fragmentos de anticuerpo IgG en una muestra, caracterizada de tal manera que la muestra se incuba con la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG y, después de la incubación con la N-glucosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum*, el agente reductor tricloroetilfosfato y el ácido fórmico, se analizan los fragmentos obtenidos mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas.

55 Un aspecto de la presente invención también es un kit para la detección de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, caracterizado de tal manera que el kit contiene

60 i) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG procedente de *S. pyogenes*,

ii) la endoglucosidasa N-glucosidasa F procedente de *Flavobacterium meningosepticum*, y

iii) tricloroetilfosfato y ácido fórmico.

65 Descripción detallada

El presente estudio hace referencia al análisis de los productos de degradación y las modificaciones de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, que se forman, por ejemplo, durante la producción del anticuerpo, el almacenamiento del anticuerpo, o por las condiciones de estrés durante la formulación del anticuerpo.

5 Un "polipéptido" es un polímero formado por aminoácidos que se enlazan entre sí mediante enlaces peptídicos. Puede producirse enzimáticamente o sintéticamente. Los polipéptidos que contienen menos de 20 aminoácidos también se conocen como "péptidos".

10 Una "proteína" es una macromolécula que contiene dos o más polipéptidos o es un polipéptido compuesto por más de 100 aminoácidos. Una proteína también puede contener un componente no peptídico tal como, por ejemplo, carbohidratos. Los carbohidratos y las otras modificaciones no peptídicas se añaden en la célula que expresa la proteína y, por consiguiente, dependen del tipo celular. En esta solicitud, las proteínas se definen por su secuencia de aminoácidos. Las modificaciones como los carbohidratos no se describen explícitamente pero siempre pueden estar presentes.

15 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", que se utilizan como sinónimos en esta solicitud, describen una molécula que contiene al menos dos cadenas polipeptídicas ligeras (LC) y dos cadenas polipeptídicas pesadas (HC). Cada uno de los polipéptidos ligeros y pesados contiene una región variable (normalmente el extremo amino terminal del polipéptido) que incluye el dominio de unión para unirse a un antígeno. Cada uno de los polipéptidos ligeros y pesados contiene una región constante (normalmente el extremo carboxi terminal del polipéptido) que es responsable, por ejemplo, de la unión del anticuerpo a las células. Un polipéptido ligero o una cadena ligera (LC) se compone habitualmente de un dominio variable V_L y un dominio constante C_L . Un polipéptido pesado o una cadena pesada (HC) se compone habitualmente de un dominio variable V_H y una región constante que, a su vez, se compone por los dominios C_{H1} , bisagra, C_{H2} , C_{H3} y opcionalmente C_{H4} . Los anticuerpos pueden producirse de numerosas formas como, por ejemplo, Fv, Fab, y F(ab)₂, así como en forma de monocadenas (scFv) (por ejemplo, Houston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; y Hood, L. E., et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984) y Hunkapiller, T., y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16). Los anticuerpos (inmunoglobulinas, Ig) se dividen en varias clases con relación a la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas clases se subdividen de forma adicional en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 o IgA en IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de las cadenas pesadas se denominan α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) y μ (IgM) con relación a la clase a la que el anticuerpo pertenece.

25 Los expertos en la materia conocen los métodos cromatográficos generales, como por ejemplo, Chromatography, 5ª edición, Parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed.); Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Holanda, (1998); Chromatography Today, Poole, D.F., y Poole, S.K., Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M., et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

40 Los anticuerpos son macromoléculas biológicas que pueden estar sujetas a modificaciones y procesos de degradación. Pueden estar basados en procesos enzimáticos (catalíticos) o no enzimáticos (no catalíticos) (Perkins, M., et al., Pharm. Res. 17 (2000) 1110-1117). A continuación se describen algunos ejemplos de reacciones de degradación no enzimáticas que ocurren habitualmente.

Oxidación de aminoácidos

50 La oxidación de anticuerpos corresponde a una modificación covalente de los aminoácidos de la cadena pesada y ligera que se induce mediante especies reactivas de oxígeno. Aunque, en principio, casi todos los aminoácidos pueden oxidarse, las metioninas (M) y los triptófanos (W) son los más sensibles a la oxidación. La oxidación de estos aminoácidos (ver figura 1) tiene un interés particular debido a que ocurre en muchas proteínas diferentes y, a menudo, reduce o elimina su actividad biológica, induce la agregación y promueve la proteólisis (Houde, D., et al., J. Chromatogr. A 1123 (2006) 189-198). Una oxidación simple de la metionina hacia sulfóxido de metionina da como resultado una diferencia de masa de $\Delta m = +16$ Da para la especie oxidada. Los triptófanos habitualmente se oxidan dos veces, lo que resulta en una diferencia de masa de $\Delta m = +32$ Da. En una reacción adicional, la forma doblemente oxidada del triptófano habitualmente se reorganiza en la quinurenina, lo que resulta en una diferencia de masa de $\Delta m = +4$ Da.

Desamidación de aminoácidos

60 La desamidación de los aminoácidos en las moléculas de anticuerpo puede tener lugar en las asparaginas (N) y las glutaminas (Q). No obstante, habitualmente se afecta la asparagina. Además, ciertas secuencias de aminoácidos y combinaciones de aminoácido, tales como asparagina y glicina (NG), asparagina y serina (NS) y asparaginas y treonina (NT) son particularmente susceptibles. La desamidación de la asparagina es la causa principal de la

degradación de moléculas biológicas durante el almacenamiento. Inicialmente, las desamidaciones del anticuerpo plegado e intacto sólo tienen lugar lentamente bajo condiciones de estrés. Las desamidaciones se facilitan cuando se destruye la estructura tridimensional del anticuerpo tras, por ejemplo, reducciones y escisiones enzimáticas, ya que en estos casos los aminoácidos son más accesibles para reaccionar con el medio circundante (figura 2). Las asparaginas pueden formar amidas cíclicas (succinimidas) en forma de un producto intermedio que se hidroliza espontáneamente en una mezcla de péptidos isoaspartilo y aspartilo, en una proporción de aproximadamente 3:1 (Chelius, D., et al., Anal. Chem. 77 (2005) 6004-6011). Preferiblemente, esta reacción tiene lugar a valores de pH básicos. Como resultado de la desamidación de asparagina en aspartato e isoaspartato aparece una diferencia de masa de $\Delta m = + 1$ Da para las especies desamidadas. En el caso de péptidos y proteínas que tienen un peso molecular mayor a los 10 kDa, resulta imposible o muy dificultoso detectar directamente una diferencia de masa de $\Delta m = + 1$ utilizando los espectrómetros de masa actuales. Además, tiene lugar un cambio en la distribución de las cargas, y para ser más precisos, de la heterogeneidad de las cargas.

Formación de enlaces tioéter

La formación de puentes de tioéter no reductibles es un fenómeno que se observa frecuentemente con los anticuerpos monoclonales, especialmente con los de la subclase IgG1. Esto se basa en la pérdida de un átomo de azufre en los puentes de disulfuro que enlazan conjuntamente las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, o que estabilizan intramolecularmente las cadenas ligeras y pesadas. Esta modificación de un anticuerpo se ve favorecida bajo condiciones de aumento del estrés y, en este caso, específicamente a valores de pH aumentados. Se asume que tal reacción es una β -eliminación (Cohen, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc., 129 (2007) 6976-6977). Dado que se pierde un átomo de azufre durante la formación de un puente de tioéter, como resultado se obtiene una diferencia de masa de $\Delta m = -32$ Da para la especie de anticuerpo modificado no reducido. En contraste con esto, el puente de disulfuro (S-S) se escinde en dos grupos SH durante la reducción de un anticuerpo. Por esta razón, la diferencia de masa de los componentes del anticuerpo reducido es de $\Delta m = -34$ Da.

Formación de fragmentos

Habitualmente, las reacciones de fragmentación inducidas por el estrés se basan en escisiones hidrolíticas de los enlaces peptídicos de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, por ejemplo, de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo. En principio, la proteólisis y, por consiguiente, la hidrólisis de los enlaces peptídicos puede tener lugar entre todos los aminoácidos, especialmente si existe tensión estérica o si hay cadenas laterales de otros aminoácidos que favorecen la hidrólisis.

Escisiones específicas de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales son proteínas muy grandes y, consecuentemente, son extremadamente heterogéneos (microheterogeneidad) debido a las glicoestructuras de sus cadenas pesadas. Con tal de examinar los anticuerpos para la formación de productos de degradación y modificaciones es conveniente escindirlos en fragmentos más pequeños antes del análisis. Por consiguiente, la escisión de los anticuerpos como parte de la preparación de una muestra es un método importante para llevar a cabo investigaciones analíticas. En la mayoría de los casos, el anticuerpo simplemente se descompone en sus cadenas pesadas y ligeras mediante la reducción de los puentes de disulfuro. Además, no obstante existen otros métodos para la escisión de un anticuerpo.

Escisión de puentes de disulfuro

Todos los puentes de disulfuro presentes en una molécula IgG pueden escindirse mediante reducción. Las cadenas pesadas y ligeras libres de un anticuerpo se obtienen durante la reducción. La Tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) es un agente reductor que se utiliza habitualmente debido a que se escinden completamente todos los enlaces disulfuro de un anticuerpo en un corto periodo de tiempo y la reducción tiene lugar dentro del rango de pH completo (véase, por ejemplo Hau, J.C. y Hau, C.Y., Anal. Biochem. 220 (1994) 5-10). En una realización, el intervalo de pH es de entre 1,5 y 8,5. El Ditioneitol (DTT) también se caracteriza por una escisión rápida de los puentes de disulfuro. No obstante, la reducción con DTT en un ambiente ácido tiene lugar de manera muy pobre. Generalmente, se necesita un paso de desnaturalización para completar la disociación de las cadenas pesadas y ligeras. Además, la desnaturalización hace que los grupos disulfuro sean más accesibles. La desnaturalización puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de guanidina/HCl o ácido fórmico.

Escisiones enzimáticas

La papaína, una proteasa de cisteína, escinde los enlaces peptídicos de forma relativamente inespecífica después de la arginina (R), la lisina (K), el ácido glutámico (E), la histidina (H), la glicina (G) y la tirosina (Y). Si el periodo de incubación es suficientemente largo, la digestión con papaína da lugar a una hidrólisis total. No obstante, los anticuerpos pueden escindirse selectivamente en su región bisagra mediante una proteólisis limitada (Lottspeich, F., y Engels, J.W., "Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag" Múnich 2ª edición (2006) 201-214). La escisión tiene lugar en el lado N-terminal de los puentes de disulfuro que conectan las dos cadenas pesadas. Los puentes de disulfuro se conservan en este proceso para obtener tres fragmentos (2 fragmentos Fab, 1 fragmento Fc) después

de la digestión. Los dos fragmentos N-terminales se conocen como los fragmentos de unión al antígeno (Fab, fragmento de unión al antígeno), el fragmento C-terminal se conoce como el fragmento cristalino (Fc, fragmento de cristalización). Cada fragmento Fab está compuesto por una cadena ligera completa y la mitad aminoterminal de la cadena pesada. El fragmento Fc se compone de las dos mitades carboxiterminales de las cadenas pesadas, que aún están unidas conjuntamente por el puente de disulfuro.

Digestión con IdeS

La IdeS (enzima que degrada la inmunoglobulina G de *S. Pyogenes*) es una proteasa de cisteína celular que puede aislarse a partir de la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*. Esta enzima escinde la IgG humana con una alta especificidad directamente antes de la secuencia de reconocimiento GPSVFLFP. Esta secuencia se localiza en la región bisagra de la IgG en el lado C-terminal de los puentes disulfuro que unen dos cadenas pesadas (HC) conjuntamente. La escisión da como resultado los extremos C-terminales de las dos cadenas pesadas (2 fragmentos HC-Fc) y un fragmento Fab", que se forma a partir de los brazos de los fragmentos Fab de las cadenas ligera y pesada que están unidas mediante puentes de disulfuro (figura 3) (von Pavel-Rammingen, U., et al., EMBO Journal 21 (2002) 1607-1615).

Si los fragmentos de IdeS del anticuerpo se reducen con DTT o TCEP tras la digestión, se obtienen las dos cadenas ligeras del anticuerpo (2 LC) y los fragmentos N-terminales de las cadenas pesadas (2 HC Fab) en lugar del fragmento Fab". Los extremos C-terminales de la cadena pesada (HC-Fc) no se afectan por la reducción.

Deglicosilación

La enzima N-glucosidasa F es lo que se conoce como endoglucosidasa y escinde completamente las estructuras de azúcares de las glucoproteínas, por ejemplo, de la cadena pesada de los anticuerpos, entre la cadena polipeptídica y el residuo de N-acetilglucosamina proximal.

Con tal de simplificar los espectros de masas tan complejos que a veces se obtienen en el análisis de las mezclas de varias proteínas o componentes peptídicos mediante la separación previa de los componentes, se lleva a cabo la espectrometría de masas en combinación con los métodos de cromatografía líquida (LC/MS). Para este fin, se utilizan sistemas de HPLC de alto rendimiento, entre otros, para separar las mezclas de las sustancias disueltas de acuerdo con sus componentes antes del análisis espectrométrico de masas. Como resultado de la separación cromatográfica de una mezcla de analitos, los componentes dejan la columna de separación en momentos diferentes y, de esta forma, se pueden analizar mediante la espectrometría de masas en el orden de su elución.

Se obtiene un espectro de masa de cada pico del perfil de elución mediante la conjunción de la cromatografía con la espectrometría de masas. La ventaja de esto es que no se obtiene un espectro total complejo de todos los componentes de la solución de analitos sino que, en un caso ideal, se obtiene el espectro homogéneo de un componente separado.

El método del electropulverización (ESI) es un método de ionización utilizado frecuentemente para la conversión de moléculas disueltas en iones gaseosos en la espectrometría de masas. Esto se consigue mediante la dispersión de un líquido en un campo electrostático (electropulverización). En este proceso se forman muchas gotitas pequeñas cargadas que contienen las moléculas analitas.

La formación de iones altamente cargados es característica del proceso ESI. Por lo tanto, en el espectro de masas de una especie de proteína definida se observa una serie completa de señales iónicas, cada una de las cuales tiene una diferencia de carga de $\Delta z = 1$ (como norma, mediante la adición de un protón en el modo positivo o la sustracción de un protón en el modo negativo) de acuerdo con su peso molecular. Los espectros de las proteínas muestran una distribución de cargas característica con una forma aproximada de campana de los iones moleculares. El máximo de la distribución depende de los parámetros del espectrómetro de masas ESI, del pH del disolvente y del estado de desnaturalización de la proteína. Tras la escisión de los puentes de disulfuro, y como resultado de la desnaturalización, las proteínas adoptan una estructura más expandida en el espacio, de modo que la molécula puede aceptar (o liberar) las cargas. Por tanto, el máximo de la distribución de las cargas puede pasar a cargas superiores (inferiores).

El número de cargas n de un ión molecular cargado de forma múltiple y, por consiguiente, el peso molecular (M), pueden calcularse a partir de las proporciones de m/z medidas (m) de cualquier par de iones moleculares consecutivos ($m_2 > m_1$) de una distribución de cargas:

fórmula 1:

$$m_1 = \frac{M + nX}{n}$$

fórmula 2:

$$m_2 = \frac{M + (n-1)X}{(n-1)}$$

X en esta conexión es la masa del portador de la carga, es decir, $X = 1$ (en el modo positivo) para la adición de un protón y $X = -1$ (en el modo negativo) para la sustracción de un protón. El valor de n puede calcularse mediante la resolución de la variable n y la igualación de las fórmulas 1 y 2:

fórmula 3:

$$n = \frac{m_2 - X}{m_2 - m_1}$$

El peso molecular del ión molecular puede calcularse mediante la resolución de M en la fórmula 2 y la utilización del resultado calculado de n en la fórmula 3:

fórmula 4:

$$M = n(m_1 - X)$$

Habitualmente, los espectros se analizan con la ayuda de programas informáticos que pueden utilizarse para determinar el peso molecular de todas las señales o de señales individuales seleccionadas. Como resultado, se obtienen las llamadas reconstrucciones, que muestran un espectro determinado recalculado para un intervalo de peso molecular correspondiente (espectros simplificados). Ahora, el peso molecular puede leerse directamente a partir de los picos calculados.

Se observó que, de modo sorprendente, los problemas que ahora ocurren con los métodos utilizados previamente pueden prevenirse mediante la utilización de un método de acuerdo con la presente invención. También se observó, de manera sorprendente, que la utilización de la enzima IdeS es ventajosa en la realización de los análisis LC/MS de anticuerpos.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención es un método para la detección de anticuerpos IgG y fragmentos de anticuerpos IgG en una muestra, caracterizado de manera que incluye los siguientes pasos:

a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo IgG y/o sus productos de escisión,

b) incubar la muestra proporcionada según a) con

i) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG,

ii) N-glucosidasa F,

iii) el agente reductor tricloroetilfosfato y ácido fórmico

donde la incubación en los pasos b)-i), b)-ii) y b)-iii) es secuencial,

c) analizar la muestra incubada según b) mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas para detectar el anticuerpo intacto y para detectar fragmentos del anticuerpo contenidos en la solución que se proporciona según a).

La muestra proporcionada puede ser, por ejemplo, una solución que contiene el anticuerpo, tal como una solución reconstituida a partir de una formulación de anticuerpo liofilizada. Las moléculas modificadas del anticuerpo se han formado en esta solución durante el almacenamiento y la liofilización. Estas modificaciones son, entre otras, la oxidación y la desamidación de aminoácidos individuales, la formación de enlaces tioéter y la formación de fragmentos de anticuerpo.

El método de acuerdo con la invención incluye la incubación de la muestra con diferentes agentes. Estos agentes se utilizan para convertir las moléculas del anticuerpo y las moléculas de los fragmentos del anticuerpo en la muestra en fragmentos definidos. El primer paso de incubación es la escisión de la molécula con la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG, preferiblemente la IdeS procedente de *Streptococcus pyogenes* o *Treponema denticola*. En una realización preferible adicional, la proteasa de cisteína específica para IgG presenta la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°: 1. La incubación con la proteasa de cisteína específica para IgG tiene lugar, en una realización, en un intervalo de pH de entre 5,5 y 8,5. En una realización, la incubación se da en un intervalo de pH de entre 7,0 y 8,0. También se observó que la proporción molar entre la proteasa de cisteína específica para IgG y las moléculas del anticuerpo (incluyendo las moléculas de los fragmentos del anticuerpo) debería de ser de entre 1:25 y 1:2500, en una realización preferible, entre 1:25 y 1:100.

El segundo paso de incubación es la escisión de los carbohidratos de los fragmentos del anticuerpo con la ayuda de una glucosidasa. La glucosidasa es la N-glucosidasa F, también conocida como PNGasa F. En una realización, la N-glucosidasa F deriva de *Flavobacterium meningosepticum*. En una realización, la glucosidasa es EC 3.2.218. En una realización adicional, la glucosidasa presenta la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°: 2.

Es ventajoso incubar en primer lugar la muestra proporcionada con la proteasa de cisteína específica para IgG y,

subsiguientemente, tratarla con la glucosidasa.

En el tercer paso se escinden los puentes de disulfuro mediante la adición de un agente reductor y, preferiblemente, mediante la adición de tricloroetilfosfato (TCEP). En una realización, se añade ácido fórmico simultáneamente a la adición de un agente reductor.

Se utiliza una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas para analizar los fragmentos del anticuerpo definidos que se obtienen. Los fragmentos individuales se separan mediante cromatografía líquida y pueden determinarse subsiguientemente mediante la espectrometría de masas. En una realización, la espectrometría de masas es una espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electropulverización (ESI-TOF). En una realización, la cromatografía líquida es una cromatografía de interacción hidrofóbica o una cromatografía de interacción π - π . En el caso de la cromatografía de interacción hidrofóbica, el ligando de la cromatografía en una realización es un ligando C8 o C18 que se localiza en un material para cromatografía que tiene un tamaño de poro de 300 \AA , o en el caso de la cromatografía de interacción π - π se utiliza un ligando difenilo como ligando de la cromatografía. En una realización, para la cromatografía líquida se utiliza o bien una columna Júpiter C18 o una columna Zorbax 300SB C8 o bien una columna Pursuit de difenilo, en una realización preferible una columna Pursuit de difenilo.

Además, la invención hace referencia a la utilización de una proteasa de cisteína IdeS específica para IgG procedente de *Streptococcus pyogenes* para la detección de anticuerpos IgG o fragmentos de anticuerpos IgG en una muestra, caracterizada de tal manera que la muestra se incuba con la proteasa de cisteína específica para IgG y los fragmentos obtenidos se analizan tras la incubación con N-glucosidasa F, el agente reductor tricloroetilfosfato y ácido fórmico mediante la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para la detección de anticuerpos IgG o fragmentos de anticuerpos IgG, caracterizado de tal manera que el kit contiene

- i) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG procedente de *S. pyogenes*
- ii) la endoglucosidasa N-glucosidasa F procedente de *Flavobacterium meningosepticum*,
- iii) tricloroetilfosfato y ácido fórmico.

En primer lugar, se ensayó la reducción de la proporción entre la enzima y el anticuerpo y del tiempo de incubación con tal de optimizar las condiciones de incubación de la digestión con IdeS. Por razones prácticas, eran preferibles un tiempo de incubación lo más corto posible y una proporción entre la enzima y el anticuerpo lo más pequeña posible, dado que la presencia del componente de la enzima en la solución de analitos del anticuerpo digerido puede llevar a la interferencia de las señales en el espectro de masas que se obtiene. La cantidad de enzima utilizada para la digestión del anticuerpo debería de ser tan pequeña como fuese posible con tal de evitar este hecho. Al mismo tiempo, se debe asegurar que la molécula del anticuerpo se escinde completamente tras la digestión. Con tal de lograr, de manera adicional, el rendimiento más alto posible de la muestra y de optimizar el tiempo de curso experimental, se debería acortar el periodo de incubación mientras se asegura una digestión completa. Los resultados de la separación en el gel electroforético de las preparaciones de la digestión (cf. figura 7) mostraron que, bajo todas las condiciones de digestión, se formaron dos bandas principales (a aproximadamente 100 kDa y aproximadamente 25 kDa) que se corresponden con los productos esperados de la escisión con IdeS. La banda principal mayor, con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa se corresponde con la parte "Fab esperada del anticuerpo, que contiene las dos cadenas ligeras (LC) y los fragmentos Fab de la cadena pesada (HC). La banda principal menor, con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa es el fragmento esperado Fc de la HC. Los resultados de la separación en el gel electroforético de las preparaciones de la digestión muestran que la proporción entre la enzima y el anticuerpo tiene un efecto más significativo en la digestión con IdeS. Con respecto a la eficiencia de la digestión con IdeS de las diversas preparaciones, los resultados del SDS-PAGE muestran que la banda del anticuerpo intacto (2HC/2LC) aún aparece con una intensidad mínima en una proporción entre la enzima y el anticuerpo de 1:50 y los periodos de incubación de 0,5 h. y 1 h. (cf: figura 7A, carriles 6 y 9). Con la misma proporción entre la enzima y el anticuerpo y con periodos de incubación de 2 h. y 5 h. (cf: figura 7B, carriles 6 y 9) la banda de la molécula intacta del anticuerpo ha desaparecido. Por lo tanto, el tiempo de incubación preferible es de entre dos y cinco horas y, particularmente preferible, de dos horas. También se observó que un periodo de incubación de 18 h. y las proporción entre la enzima y el anticuerpo de 1:50, 1:500, 1:2500, 1:10000 no resultaron en diferencia alguna en comparación con la incubación de cinco horas bajo las mismas proporciones entre la enzima y el anticuerpo. Así, es preferible una proporción entre la enzima y el anticuerpo de entre 1:25 y 1:100. Es particularmente preferible una proporción entre la enzima y el anticuerpo de 1:50.

El método basado en LC/MS incluye un método para la preparación de una muestra que es particularmente adecuado para la separación y la detección de productos de degradación inducidos por el estrés. En principio, existen cuatro variantes posibles de la preparación de la muestra:

1. sólo la reducción del anticuerpo;

2. la deglicosilación con la subsiguiente reducción del anticuerpo;
3. la digestión con IdeS con la subsiguiente reducción del anticuerpo;
- 5 4. la deglicosilación con la subsiguiente digestión con IdeS y la reducción del anticuerpo.

Se ha observado que la preparación que solo se ha reducido (variante 1) y la preparación digerida con IdeS y reducida (variante 3) no son adecuadas para el análisis LC/MS de las soluciones de anticuerpos, debido a los espectros heterogéneos obtenidos a causa de las glicoestructuras de las cadenas pesadas, que reducen la sensibilidad de la medición de la LC/MS y dificultan más el análisis.

Sorprendentemente, se observó que la preparación de la muestra digerida con IdeS, deglicosilada y reducida es preferible a la preparación de la muestra deglicosilada y reducida, debido a que se obtienen fragmentos menores del anticuerpo, lo que tiene un efecto positivo en la resolución de la masa en las mediciones de la LC/MS y permite que las modificaciones que pueden estar presentes se localicen y se asignen en la parte HC-Fc o en la parte HC-Fab del anticuerpo. Además, debido a la escisión de la cadena pesada, es posible amplificar el efecto de las modificaciones inducidas por el estrés que pueden ocurrir en el procedimiento cromatográfico del fragmento, con tal de mejorar su separación la una de la otra. No surgieron problemas a causa de la utilización simultánea de las dos enzimas IdeS y N-glicosidasa F.

Se ha observado que, por razones prácticas, es particularmente ventajoso digerir en primer lugar el anticuerpo con IdeS y después deglicosilarlo. Se cambió el procedimiento de este modo por razones prácticas y no se observó ningún efecto significativo en el resultado de los análisis. Se añade ácido fórmico simultáneamente a la adición la solución de TCEP, es decir, tanto el ácido fórmico como la solución de TCEP se añaden con anterioridad a la incubación, para que así ambos componentes estén presentes durante una única incubación.

Con tal de detectar y cuantificar de forma inequívoca y simple la formación de productos de degradación de las soluciones del anticuerpo, es ventajoso separar las especies de degradación respectivas. La calidad de la separación de una solución analita se ve influenciada significativamente, entre otros, por las propiedades cromatográficas de la fase estacionaria. La calidad de las separaciones cromatográficas se evaluó en base a la resolución del pico y la nitidez del pico de la columna respectiva.

En la selección de las columnas, se han tenido en consideración otros parámetros adicionales importantes para la separación, además de la polaridad de la matriz de la columna, tales como que, por ejemplo, el tamaño de las partículas debería ser lo más pequeño posible con tal de lograr el mayor número posible de placas. Además, debería tenerse en cuenta que los anticuerpos son moléculas muy grandes. Consecuentemente, el tamaño del poro de las partículas de la matriz también juega un papel decisivo en la selección de una columna adecuada. Cuanto más grande son los poros de las partículas de la matriz, más fácil es la difusión de los componentes del anticuerpo a través de los poros, lo que mejora la separación.

En comparación con la columna Júpiter C18, que se utilizó como columna de referencia, no se obtuvo ninguna mejora efectiva en la separación de los productos de degradación con la columna Vydac C4, bajo las condiciones cromatográficas empleadas. La columna Zorbax 300SB C8 tiene una selectividad cromatográfica diferente a la columna Júpiter C18, y también produce un resultado comparativamente bueno en la separación de los diversos fragmentos del anticuerpo. En contraste, la columna Pursuit de difenilo mostró un resultado de separación mejorado. El perfil de separación de esta columna mostró más picos y hombros, que aparecieron en el perfil de elución con una buena resolución y una nitidez de pico aceptable, en comparación con el perfil de separación de la columna Júpiter C18. Por consiguiente, esta columna es preferible para la separación de los productos de degradación del anticuerpo que se obtuvieron de acuerdo con el método de la invención.

Mediante los siguientes ejemplos, referencias literarias y figuras se pretende elucidar de forma adicional la invención. El ámbito protector actual deriva de las reivindicaciones anexas a esta invención.

La invención se describe en los siguiente ejemplos en base a un anticuerpo ejemplo (mAb IGF-1R). Este hecho no constituye ninguna limitación de la invención, sino que tiene la mera intención de ilustrarla.

Un ejemplo de un anticuerpo (preferiblemente monoclonal) es un anticuerpo contra el receptor de IGF-1 (mAb IGF-1R) tal y como se describe, por ejemplo en las patentes WO 02/053596, WO 2004/071529, WO 2005/016967 WO 2006/008639, US 2005/0249730, US 2005/0084906, WO 2005/058967, WO 2006/013472, WO 2006/00181, US 2003/0165502, WO 2005/082415, WO 2005/016970, WO 03/106621, WO 04/083248, WO 2003/100008, WO 2004/087756, WO 2005/005635, WO 2005/094376 y WO 2007/115814.

Descripción de las figuras:

65 Figura 1: reacción de oxidación de la metionina (a) y el triptófano (b) como ejemplo (véase, por ejemplo, Taylor, S., et al., J. Biol. Chem. 278 (2003) 19587-19590).

Figura 2: desamidación de la asparagina e isomerización del aspartato; la ruta I es preferible bajo condiciones básicas (pH > 8), la ruta II es preferible bajo condiciones ácidas (pH < 5).

Figura 3: representación esquemática de la digestión con IdeS de los anticuerpos IgG1.

Figura 4: resultado de la separación electroforética en gel del anticuerpo incubado a 40°C y almacenado a -80°C.

- Carril 1 – muestra tampón;
- Carril 2 – peso molecular estándar;
- Carril 3 – muestra tampón;
- Carril 4 – estándar, no reducido;
- Carril 5 – anticuerpo (-80°C), no reducido;
- Carril 6 – anticuerpo (30 días/40°C), no reducido;
- Carril 7 – muestra tampón;
- Carril 8 – estándar, reducido;
- Carril 9 – anticuerpo (-80°C) reducido;
- Carril 10 – anticuerpo (30 días/40°C), reducido;
- Carril 11 – muestra tampón;
- Carril 12 – muestra tampón.

Figura 5: superposición de los cromatogramas SEC de los anticuerpos bajo estrés (1: 40°C, 30 días) y sin estrés (2: -80°C) y del tampón placebo (3) incubado a 40°C.

Figura 6: cromatogramas de la cromatografía de intercambio iónico de las soluciones de los anticuerpos bajo estrés (1: 40°C, 30 días) y sin estrés (2: -80°C) y de la solución del tampón placebo (3) incubado a 40°C.

Figura 7: separación del anticuerpo digerido con IdeS a diversas proporciones entre la enzima y el anticuerpo (1:50 - 1:1250) y varios periodos de incubación (0,5 h. - 5h.):

- Número de carril – gelA – gelB:
- 1 – muestra tampón – muestra tampón;
- 2 – peso molecular estándar – peso molecular estándar;
- 3 – estándar – estándar;
- 4 – anticuerpo no digerido – anticuerpo no digerido
- 5 – muestra tampón – muestra tampón;
- 6 – 1:50, 0,5 h. – 1:50, 2,0 h.;
- 7 – 1:125, 0,5 h. – 1:125, 2,0 h.;
- 8 – 1:1250, 0,5 h. – 1:1250, 2,0 h.;
- 9 – 1:50, 1,0 h. – 1:125, 5,0 h.;
- 10 – 1:125, 1,0 h. – 1:125, 5,0 h.;
- 11 – 1:1250, 1,0 h. – 1:1250, 5,0 h.;
- 12 – muestra tampón – muestra tampón.

Figura 8: superposición de los perfiles de elución de los anticuerpos bajo estrés y sin estrés en la columna estándar Júpiter C18 (A) y la columna Pursuit de difenilo (B).

Figura 9: superposición de los perfiles de elución de los anticuerpos bajo estrés (1) y sin estrés (2) en la columna de difenilo Pursuit.

Ejemplo 1

Material y métodos

El anticuerpo que se utilizó en los experimentos de esta investigación es un anticuerpo humano recombinante del tipo IgG1. Este anticuerpo se expresa en las células CHO y se purificó mediante la cromatografía de afinidad y varios pasos de la cromatografía de intercambio iónico.

Estrés térmico

Se retamponaron aproximadamente 22 mg del anticuerpo IgG1 mediante la diálisis en 10 mM de un tampón de Tris/HCl (pH 8,5). Una parte de la solución del anticuerpo retamponado se incubó a 40°C durante 30 días. La otra parte se congeló a -80°C como control.

Diálisis

Para la diálisis, se transfirieron 1,5 ml de la solución del anticuerpo (c = 14,6 mg/ml) a un cartucho de diálisis slide-A-Lyzer (capacidad: 0,5 - 3 ml, tamaño de exclusión de peso molecular: 10 kDa) y se colgaron en el tampón de diálisis. El tampón se agitó continuamente durante la diálisis y se mantuvo a 8°C. La solución del tampón de diálisis se

renovó varias veces durante la diálisis con tal de asegurar el intercambio más completo posible de las soluciones tampón. La tabla 1 muestra el esquema temporal del intercambio de la solución tampón.

Tabla 1: esquema de la diálisis para retamponar la solución del anticuerpo

Volumen tampón de diálisis [l]	Tiempo [h.]	Temperatura [°C]
1,5	3	8
1,5	15	8
1,5	3	8

5 Tras la finalización de la diálisis, la solución del anticuerpo se transfirió del cartucho slide-A-Lyzer a un recipiente de reacción de 5 ml. El volumen de la solución del anticuerpo dializada se determinó mediante ponderación en una báscula analítica (AT261 Delta Range, Mettler-Toledo).

Filtración estéril

10 Después de la diálisis, la solución del anticuerpo se esterilizó mediante la filtración a través de un filtro de jeringa única Minisart (0,2 µm, Sartorius) bajo condiciones de bajo nivel de gérmenes. El muestreo para la determinación de la concentración del anticuerpo también se llevó a cabo bajo condiciones de bajo nivel de gérmenes.

15 Determinación de la concentración del anticuerpo

La concentración del anticuerpo se determinó mediante una medición de la absorción a 280 nm en un fotómetro espectral del tipo Uvikon XL (Goebel Company). El coeficiente de extinción del anticuerpo que se utilizó fue de 1,55 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ y se calculó de acuerdo con el método de Pace, C.N., et al., (Protein Sci. 4 (1995) 2411-2423).

20 SDS PAGE

25 Las soluciones del anticuerpo se separaron mediante electroforesis en gel utilizando una estación de electroforesis Power Ease 300, así como geles, tampones y otros agentes de Invitrogen Company. Para la separación, se utilizó un gel de Tris-glicina con un gradiente de 4-20%. El tampón de migración de Tris-glicina SDS (10x), que se diluyó 1:10 (v/v) antes de su utilización con agua doblemente destilada, se utilizó como tampón de migración.

30 Las soluciones del anticuerpo que se incubaron a 40°C y aquellas que se almacenaron a -80°C se aplicaron bajo condiciones reductoras, así como no reductoras. Como referencia, también se aplicaron al gel 5 µl de un marcador proteico Mark 12™ para determinar el peso molecular relativo de las muestras a examen. La separación electroforética se llevó a cabo a un voltaje de 125 V y durante un tiempo de ejecución de 95 min. Tras la electroforesis en gel, los geles se tintaron con Simply Blue Safe Stain (solución de tinción Coomassie G 250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Subsiguientemente, el gel se destintó con agua doblemente destilada.

35 Los geles tintados se preservaron mediante la utilización de minicelofanes Dry-Ease y una solución de secado (glicerol al 10 % (v/v), metanol al 40 % (v/v), ácido acético al 10 % (v/v), agua al 40 % (v/v)). Para este cometido, los geles se incubaron durante 5 min. en la solución de secado y se incubaron durante otros 10 min. después de la adición de dos celofanes. A continuación, los geles se colocaron, libres de burbujas, entre los celofanes y se secaron en un marco de sujeción.

40 Para la SDS-PAGE no reductora, las soluciones del anticuerpo se diluyeron hasta una concentración de aproximadamente 1 mg·ml⁻¹ con 10 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,5). Subsiguientemente, se combinaron 10 µl (correspondientes a 10 µg de anticuerpo) de las soluciones del anticuerpo diluidas con 10 µl del tampón de la muestra de SDS (2x) en una proporción de 1:2 (v/v), se mezclaron y, finalmente, se centrifugaron brevemente. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 min. a 70°C. A continuación se volvieron a centrifugar brevemente. Para la separación electroforética se aplicaron al gel 16 µl (correspondientes a 8 µg de anticuerpo) de las muestras desnaturalizadas. Además del marcador de proteínas, se aplicó como referencia un anticuerpo de referencia estándar (c = 16,5 mg·ml⁻¹) diluido a una concentración de 1 mg·ml⁻¹ y subsiguientemente tratado del mismo modo que las muestras del anticuerpo.

50 Para la SDS-PAGE reductora, las soluciones del anticuerpo también se diluyeron con 10 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,5) hasta una concentración de aproximadamente 1 mg·ml⁻¹. Se utilizó DTT (ditiotreitól) para reducir las soluciones. La solución de DTT se preparó a una concentración de 100 mM en el tampón de la muestra de SDS (2x) con tal de asegurar una reducción completa del anticuerpo. Subsiguientemente, se combinaron 10 µl (correspondientes a 10 µg de anticuerpo) de las soluciones diluidas con 10 µl del tampón de la muestra de SDS (2x) + 100 mM de DTT en una proporción de 1:2 (v/v), se mezclaron y se centrifugaron brevemente. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 min. a 70°C. A continuación se volvieron a centrifugar brevemente. Para la separación electroforética se aplicaron al gel 16 µl (correspondientes a 8 µg de anticuerpo) de las muestras desnaturalizadas.

55

Además del marcador de proteínas, se aplicó como referencia un anticuerpo de referencia estándar ($c = 16,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) diluido a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y subsiguientemente tratado del mismo modo que las muestras del anticuerpo.

5 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se utilizó la columna de filtración en gel TSK gel G3000 SWXL (7,8 x 300 mm; 5 μm , 250 A) de Tosoh Bioscience Company para separar mediante cromatografía los componentes de las soluciones del anticuerpo de acuerdo con el tamaño. La separación se llevó a cabo en un sistema Shimadzu-HPLC. Los componentes de la muestra se eluyeron de modo isocrático con un tampón de 200 mM de fosfato de potasio, 250 mM de cloruro de potasio (pH 7,0) durante un periodo de 30 min. y a una velocidad de flujo de $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura de la columna de filtración en gel TSK gel G3000 SWXL se mantuvo constante a 25°C durante la separación. La temperatura del automuestreador fue de 6°C . Los componentes de la muestra se detectaron a una longitud de onda de 280 nm utilizando un detector de haz de diodos.

15

Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

Se utilizó la columna de intercambio catiónico débil SynChropak WCX (4,6 x 250 mm, 6 μm , 300 A) de Agilent Company para la separación cromatográfica de los componentes de las soluciones del anticuerpo. La separación se llevó a cabo en un sistema Shimadzu HPLC. Los componentes de la muestra se eluyeron con la ayuda de un sistema de gradiente binario de un eluyente A (10 mM del tampón de fosfato de sodio, pH 7,0) y un eluyente B (10 mM del tampón de fosfato de sodio, 750 mM del tampón de cloruro de sodio, pH 7,0) a una velocidad de flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y un tiempo de ejecución de 55 minutos. El perfil de elución se muestra en la tabla 2. La temperatura de la columna de intercambio catiónico SynChropak WCX se mantuvo constante a 25°C durante la separación. La temperatura del automuestreador fue de 6°C . Los componentes de la muestra se detectaron a una longitud de onda de 280 nm utilizando un detector de haz de diodos.

20

25

Tabla 2: perfil del gradiente para la separación de la solución del anticuerpo mediante la IEC

Tiempo (min.)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,0	95	5
12,0	80	20
17,0	80	20
35,0	70	30
40,0	70	30
41,0	0	100
44,0	0	100
45,0	95	5
55,0	95	5

30 Ejemplo 2

Estrés térmico

Con tal de acelerar la formación de los productos de degradación y de las modificaciones del anticuerpo monoclonal, éste se sometió a un estrés térmico definido en una incubadora (Venticell, MM-Medcenter). Para la incubación, la solución del anticuerpo dializada se incubó durante 30 días a 40°C . Además, se dividieron $250 \mu\text{l}$ de la solución del anticuerpo en alícuotas de $10 \mu\text{l}$ y se almacenaron a -80°C . Éstas sirvieron de control del punto cero.

35

Después de 30 días, las alícuotas sometidas al estrés térmico se sustrajeron de la incubadora y se examinó visualmente la presencia de infestación con microorganismos. Las alícuotas sustraídas se combinaron en un recipiente de reacción con tal de obtener un solución analítica, bajo estrés y homogénea. La homogeneización se llevó a cabo mezclando cuidadosamente la solución del anticuerpo (miniagitador MS2, IKA, Staufen). La solución del anticuerpo homogeneizada se dividió en alícuotas de $20 \mu\text{l}$ y éstas se almacenaron a -80°C .

40

Para el análisis mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, se retamponaron aproximadamente 22 mg del anticuerpo ($c = 14,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en 10 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,5) y, subsiguientemente, se incubaron durante 30 días a 40°C .

45

Preparación de la solución tampón placebo incubada con calor

Con tal de asegurar en los análisis posteriores que los cambios observados en la solución del anticuerpo, que resultan del almacenamiento a 40°C, no se deben a cambios en la solución tampón, se esterilizaron dos alícuotas de 15 ml del tampón de 10 mM Tris/HCl mediante filtración bajo condiciones de bajo nivel de gérmenes y también se incubaron en la incubadora (Venticell, MM-Medcenter) durante 30 días a 40°C. El procedimiento subsiguiente se llevó a cabo del mismo modo que para la solución del anticuerpo.

Análisis mediante electroforesis en gel de la solución incubada con calor

El resultado de la separación electroforética en gel del anticuerpo incubado a 40°C y almacenado a -80°C se muestra en la figura 4. La incubación a 40°C da como resultado la formación de agregados así como fragmentos de la molécula del anticuerpo (carriles 6 y 10). Las muestras del anticuerpo no incubadas muestran el patrón de bandas típico de una molécula IgG1 (cf. carriles 4 y 5) bajo condiciones no reductoras. La banda principal corresponde al anticuerpo intacto que consiste en dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC). Además, las bandas pueden observarse en especies de anticuerpos cuya estructura no se ha preservado completamente. Estas bandas son la especie 2HC/LC, que carece de una cadena ligera, la mitad de un anticuerpo (HC/LC), la cadena pesada libre (HC) y la cadena ligera libre (LC) (cf. carriles 4 y 5).

Este patrón de bandas típico también se observa básicamente en la muestra del anticuerpo no reducido incubada a 40°C (cf. carril 6). La banda principal vuelve a ser el anticuerpo intacto (2HC/2LC). Además, aparecen bandas para las diversas especies de anticuerpo no intacto (2HC/LC, HC/LC, HC, LC) con una intensidad mayor a la de la muestra del anticuerpo almacenada a -80°C. Adicionalmente, se forman otras bandas en la muestra bajo estrés en el intervalo que va de aproximadamente 90 kDa a > 200 kDa (cf. carril 6). Las especies que aparecen por debajo de la banda principal son los fragmentos del anticuerpo y las que aparecen por encima de la banda principal son agregados.

En la región de aproximadamente 21 kDa (cf. carril 6) aparecen dos bandas que parecen tener particular interés para el análisis mediante LC/MS. Se trata de un fragmento Fab no covalente en el que los fragmentos Fab HC (AA 1-220) y LC no se mantienen unidos por un puente disulfuro sino por interacciones no covalentes (interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de van-der-Waals). Dado que las muestras se aplican en el gel bajo condiciones desnaturalizantes, Fab HC y LC aparecen como bandas individuales en el gel (cf. carril 6). En esta conexión, la banda superior en el gel es la LC (LC*) y la banda inferior es el fragmento Fab HC (Cohen, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc., 129 (2007) 6976-6977). El anticuerpo restante, que está compuesto por el segundo fragmento Fab y el fragmento Fc, puede localizarse en la banda que aparece con una intensidad débil en la región de 97 kDa y 116 kDa (cf. carril 6).

Las bandas principales en la separación bajo condiciones reductoras son las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) (cf. carriles 8, 9 y 10). Además de las dos bandas principales, aparecen dos bandas más en las muestras del anticuerpo sin estrés en el intervalo de entre aproximadamente 97 kDa y 120 kDa, con una intensidad menor. Se trata de agregados covalentes no reductibles (cf. carriles 8 y 9).

La solución del anticuerpo incubada a 40°C muestra el mismo patrón de bandas que la solución del anticuerpo no incubada (cf. carril 10). Las dos bandas que pueden localizarse en las especies no reductibles en el caso de la muestra sin estrés, no aparecen con una intensidad mucho mayor en la muestra bajo estrés (cf. carril 10). Además de las especies ya mencionadas (HC, LC y las dos bandas covalentes no reductibles), en la solución del anticuerpo bajo estrés aparecen un gran número de bandas adicionales en el intervalo de aproximadamente 30 kDa a 200 kDa. Se trata de agregados reducidos covalentes, especies no reductibles y fragmentos de las especies reducidas (cf. carril 10).

La banda de la especie agregada no reductible que aparece en el gel entre aproximadamente los 90 kDa y los 95 kDa, y que se puede localizar en el medio anticuerpo, tiene un interés particular en el análisis LC/MS. La intensidad de esta banda aumenta significativamente como resultado de la incubación. Muy probablemente, el incremento de la intensidad en esta banda se debe a la formación de una especie de tioéter. Esta especie es una mitad de molécula de anticuerpo con una masa real de 75 kDa, cuyas HC y LC no están unidas conjuntamente mediante un puente de disulfuro sino con un puente de tioéter no reductible (Tous, G.I., et al., Anal. Chem. 77 (2005) 2675-2682).

Análisis mediante SEC de la solución incubada con calor

La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) ofrece una visión general de la formación de fragmentos inducidos por el estrés y de agregados. Dado que la SEC se lleva a cabo bajo condiciones naturales, en el análisis se detectan tanto agregados covalentes como no covalentes. Con tal de establecer una conexión entre la formación de los productos de degradación y la incubación a 40°C, además de la solución del anticuerpo bajo estrés también se analiza la muestra sin estrés que se almacenó a -80°C.

La figura 5 muestra el resultado de la SEC para la solución tampón placebo incubada a 40°C, el anticuerpo incubado a 40°C y el anticuerpo almacenado a -80°C. Para el análisis, se aplicaron en cada caso 50 µl o 50 µg del anticuerpo. Los resultados del análisis del peso molecular estándar sirvieron como referencia para determinar el tamaño del

peso molecular de los componentes de las soluciones del anticuerpo. Estos se enumeran en la tabla 4. La tabla 3 muestra los porcentajes de las diversas especies de anticuerpo en el perfil de elución. Los porcentajes calculados se basan en la proporción del área respectiva del pico de una determinada especie en relación con la suma del área de todos los picos que aparecen.

5

Tabla 3: evaluación de la SEC de los anticuerpos bajo estrés y sin estrés

	Especies de alto peso molecular (RT ~ 12 – 14,5 min.) [%]	Pico principal (RT ~ 15 – 16,5 min.) [%]	Hombro en el intervalo de bajo peso molecular (RT ~ 16,5 – 18 min.) [%]	Especies de bajo peso molecular (RT ~ 19 – 20 min.) [%]
-80°C	3,19	95,81	-	1,00
40°C/30 días	12,33	72,20	10,85	4,62

Tabla 4: resultados de la separación cromatográfica de la SEC del peso molecular estándar

Sustancia	Masa [kDa]	Tiempo de retención [min.]
tiroglobulina	670	11,9
gammaglobulina	158	15,8
ovoalbúmina	44	18,5
mioglobulina	17	20,4
vitamina B12	1,35	23,4

El perfil de elución de las especies del anticuerpo bajo estrés se correlaciona con los resultados de la SDS-PAGE. Los resultados de la SEC también muestran que se han formado agregados y que el anticuerpo se ha degradado durante la incubación (cf. figura 5).

10

Las especies principales con un tiempo de retención de aproximadamente 15 – 16,5 min., que pueden asignarse al anticuerpo intacto, disminuyen durante la incubación a 40°C desde aproximadamente el 96 % al 72 % del área total (cf. tabla 3). El tiempo de retención de la especie principal (RT 15 – 16,5 min.) se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en base al peso molecular estándar (cf. tabla 4). Los agregados con un peso molecular de > 158 kDa (cf. tabla 4) eluden en una ventana de tiempo de aproximadamente 12 – 14,5 minutos. El pico con este tiempo de elución aumenta como resultado de la incubación a 40°C desde aproximadamente el 3 % al 12 % del área total (cf. tabla 3). Se forma un hombro claro en la región descendente del pico de la especie principal (RT de aproximadamente 16,5 - 18 min.) en el perfil de elución del anticuerpo bajo estrés, que tiene una proporción del área de aproximadamente el 11 %, y que no aparece en este sentido en la solución del anticuerpo almacenada a -80°C (cf. figura 5). Las especies de anticuerpo que eluden en la región del hombro tienen un peso molecular de aproximadamente entre 70 kDa y 120 kDa (cf. tabla 4). Se trata de especies tales como la mitad del anticuerpo (HC/LC), los anticuerpos a los que les falta una cadena ligera (2HC/LC) y los fragmentos Fab + Fc. Se observa un pico adicional en el tiempo de retención de aproximadamente 19 - 20 min., al cual se puede asignar un peso molecular de entre aproximadamente 20 kDa y 40 kDa (cf. tabla 4). Las cadenas pesada (HC) y ligera (LC), así como el Fab HC del fragmento Fab no covalente, eluden en esta ventana de tiempo. Este pico aumenta como resultado de la incubación a 40°C desde el 1 % al 5 % del área total (cf. tabla 3).

15

20

25

La comparación entre el perfil de elución del tampón placebo incubado a 40°C y de la solución del anticuerpo incubada a 40°C muestra que la incubación del tampón no resulta en la aparición de ningún pico.

30

Análisis mediante la IEC de la solución incubada con calor

La cromatografía de intercambio iónico es adecuada para la detección de cambios en la carga debidos a las modificaciones de la molécula del anticuerpo.

35

Con tal de poder identificar los cambios en el anticuerpo relacionados con el estrés, además del anticuerpo incubado a 40°C, también se aplica el anticuerpo sin estrés almacenado a -80°C.

40

La figura 6 muestra los cromatogramas obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico de las soluciones de los anticuerpos bajo estrés y sin estrés, así como de la solución tampón placebo incubada a 40°C. Para el análisis, se aplicaron en cada caso 50 µl o 25 µg del anticuerpo. Los porcentajes del perfil de elución de las diversas especies se muestran en la tabla 5. Los porcentajes calculados hacen referencia a las proporciones del área respectiva del pico de una especie determinada en relación a la suma del área de todos los picos que aparecen.

45

Tabla 5: evaluación de la IEC de los anticuerpos bajo estrés y sin estrés

	Intervalo ácido (RT ~ 12 – 18 min.) [%]	Hombro en el intervalo ácido (RT ~ 19 – 22 min.) [%]	Pico principal (RT ~ 22 – 25 min.) [%]	Hombro en el intervalo básico (RT ~ 26 – 32 min.) [%]
-80°C	7,69	4,52	60,75	27,04
40°C/30días	43,83	16,57	39,60	0

Una comparación entre los perfiles de elución de los anticuerpos almacenados a -80°C y los anticuerpos incubados a 40°C muestra que, mediante la incubación, se indujo un cambio significativo en la carga sobre el intervalo ácido (cf. figura 6). Por tanto, la intensidad del pico de la especie principal (tiempo de retención RT de aproximadamente 22 - 25 min.), que puede asignarse al anticuerpo intacto, disminuyó significativamente desde el 61 % al 40 % del área total (cf. tabla 5), mientras que la intensidad de los picos en el intervalo ácido del perfil de elución (RT 12 - 18 min.) aumentó significativamente (un incremento aproximadamente desde el 8 % al 44 % del área total). El hombro que se observa en el intervalo básico de la muestra del anticuerpo sin estrés (RT 26 - 32 min.) desaparece completamente durante la incubación a 40°C (cf. figura 6). A su vez, la intensidad del hombro en la parte ácida del pico principal (RT 19 - 22 min) aumenta en el caso de la solución del anticuerpo bajo estrés. En este caso, el área aumenta desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 17 % del área total (cf. tabla 5). Una comparación entre los perfiles de elución del tampón placebo incubado a 40°C y de la solución del anticuerpo incubado a 40°C muestra que, como resultado de la incubación del tampón, no aparece ningún pico.

Habitualmente, los cambios de la carga en el intervalo ácido inducidos por la incubación de un anticuerpo se deben a las reacciones de desamidación. En las desamidaciones, se sustituye un grupo amino por un grupo hidroxilo que introduce una carga negativa adicional en la molécula. El resultado del cromatograma IEC muestra que las desamidaciones y los demás cambios en la carga ocurren en un nivel mayor a causa de la incubación a 40°C.

Ejemplo 3

Optimización de la digestión con IdeS

La enzima IdeS estaba presente en 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0) a una concentración de 1 mg/ml. Se preparó una serie de diluciones que contienen tres concentraciones diferentes de IdeS para la adición de la enzima a la solución de digestión. La concentración final de IdeS en las prediluciones (V) fue de: 0,1 mg·ml⁻¹ (V 1), 0,01 mg·ml⁻¹ (V 2) y 0,001 mg·ml⁻¹ (V 3). La dilución se llevó a cabo utilizando 50 mM del tampón Tris/HCl (pH 8,0).

El anticuerpo sujeto a análisis estaba presente a una concentración de 15,5 mg/ml en una solución tamponada de histidina, pH 6,0. La solución del anticuerpo se diluyó hasta una concentración de c = 5 mg·ml⁻¹ con 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0) para su adición a la solución de digestión.

El esquema de pipeteado para la preparación de las soluciones de digestión se enumera en la tabla 6.

Tabla 6: esquema de pipeteado para la preparación de las soluciones de digestión con IdeS

Proporción de encima	IdeS [µg]	Dilución de IdeS [µl]	Anticuerpo [µg(µl)]	50 mM de tampón Tris [µl]	Anticuerpo en la digestión
Sin encima			50 (10)	40	1 µg/µl
1:50	1,00	10 (V 1)	50 (10)	30	1 µg/µl
1:125	0,40	40 (V 2)	50 (10)	0	1 µg/µl
1:1250	0,04	40 (V 3)	50 (10)	0	1 µg/µl

Las soluciones de digestión preparadas se incubaron durante 0,5, 1,0, 2,0 y 5,0 horas a 37°C. Se preparó como control cero una solución de anticuerpo a la que no se añadió la encima. Para la solución control se añadieron mediante pipeteo 10 µl (50 µg) del anticuerpo a 40 µl de tampón Tris/HCl a 50 mM (pH 8,0). La incubación se llevó a cabo durante 5,0 h. a 37°C.

Además, se diluyó una solución de anticuerpo estándar de referencia (el anticuerpo en 20 mM de histidina, 240 mM de trehalosa, Tween 20 al 0,02 %, pH = 6,0, c = 16,5 mg·ml⁻¹) hasta una concentración de 1 mg·ml⁻¹ con 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0) como control adicional. La solución estándar de referencia se aplicó sin previa incubación.

Las diversas soluciones de digestión del anticuerpo se aplicaron bajo condiciones no reductoras.

Ejemplo 4

Comparación de diferentes métodos de preparación de la muestra

5 Sólo reducida:

Se redujeron 43 μg del anticuerpo con 0,43 M de tricloroetilfosfato (0,5 M en H_2O) a una concentración de $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con este propósito, se añadieron 38 μl de la solución TCEP (0,5 M en H_2O) a 5 μl de la solución del anticuerpo sin estrés ($c = 8,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se incubó durante 30 min. a 37°C . Subsiguientemente, se diluyó la solución del anticuerpo con ácido fórmico (1 %, v/v) a una proporción de 1:2 (v/v). Tras la dilución con ácido fórmico, la concentración del anticuerpo era de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La proporción de ácido fórmico era de 0,5 % (v/v). La solución obtenida se centrifugó (Minispin, Eppendorf) durante 2 min. a 13.400 rpm. Se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se transfirió a un tubo analítico. Se aplicaron 4 μl (2 μg) del anticuerpo a la columna en los experimentos LC/MS.

15 Digestión con IdeS y reducción:

La digestión con IdeS se llevó a cabo mediante la incubación de 43 μg del anticuerpo a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con este propósito, se diluyeron 5 μl de la solución del anticuerpo sin estrés ($c = 8,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) con 34 μl del tampón Tris/HCl a 50 mM (pH 8,0), se añadieron 4 μl de la solución IdeS (0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0)) y se incubaron durante 2 h. a 37°C . A continuación se redujeron con 0,25 M de TCEP (0,5 M en H_2O) a una concentración de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con este propósito, se añadieron 35 μl de la solución del anticuerpo digerido ($c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 35 μl de la solución TCEP (0,5 M en H_2O) y se incubó durante 30 min. a 37°C . Subsiguientemente, se diluyó la solución del anticuerpo con ácido fórmico (1 %, v/v) a una proporción de 1:2 (v/v). Tras la dilución con ácido fórmico, la concentración del anticuerpo era de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La proporción de ácido fórmico era de 0,5 %. La solución del anticuerpo obtenida se centrifugó (Minispin, Eppendorf) durante 2 min. a 13.400 rpm. Se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se transfirió a un tubo analítico. Se aplicaron 8 μl (2 μg) del anticuerpo a la columna en los experimentos LC/MS.

30 Ejemplo 5

Método analítico LC-MS

En primer lugar, el anticuerpo se digirió con IdeS, luego se deglicosiló y, subsiguientemente se redujo para los análisis LC/MS para caracterizar los productos de degradación del anticuerpo.

Digestión con IdeS

Para la digestión con IdeS, en cada caso se añadieron 4 μl de la solución de IdeS ($c = 0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en 50 mM de tampón Tris/HCl, pH 8,0) a 7,9 μl del anticuerpo bajo estrés ($c = 6,26 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y a 5,8 μl del anticuerpo sin estrés ($c = 8,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). La solución se diluyó con 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0) hasta una concentración del anticuerpo de $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se incubó durante 2 h. a 37°C . La proporción entre la enzima y el anticuerpo era de 1:50.

45 Deglicosilación con N-glucosidasa F

Se escindieron las glicoestructuras de la cadena pesada del anticuerpo con la ayuda de la enzima N-glucosidasa F. Los azúcares unidos mediante enlaces N-glicosídicos se escindieron tras la digestión con IdeS mediante la incubación a una concentración del anticuerpo de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en 50 mM de tampón Tris/HCl (pH 8,0). La escisión se inició mediante la adición de 0,5 μl (actividad: $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) de N-glucosidasa F. La incubación se llevó a cabo durante 4 h. a 37°C .

Reducción - Ejemplo 1

La reducción se llevó a cabo tras la digestión con IdeS y la deglicosilación mediante la adición de 60 μl de TCEP (tricloroetilfosfato; 0,5 M en H_2O). Subsiguientemente, la mezcla se diluyó con ácido fórmico (1 %, v/v) a una proporción de 1:2 (v/v) para obtener una concentración de $0,16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ del anticuerpo en la solución de reducción. La concentración de TCEP era de 0,1 M, la proporción del ácido fórmico en la solución era de 0,5 % (peso/volumen). La incubación se llevó a cabo en presencia de ácido fórmico y TCEP durante 30 min. a 37°C . Subsiguientemente, la solución del anticuerpo que se obtuvo se centrifugó durante 2 min. a 13.400 rpm (Minispin, Eppendorf). Se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se transfirió a un tubo analítico. Se aplicaron 13 μl (2 μg) del anticuerpo a la columna en el experimento LC/MS (figura 8).

Reducción - Ejemplo 2

La reducción se llevó a cabo tras la digestión con IdeS y la deglicosilación mediante la adición de 60 μl de TCEP (tricloroetilfosfato; 0,5 M en H_2O). Subsiguientemente, la mezcla se diluyó con ácido fórmico (1 %, v/v) a una

5 proporción de 1:2 (v/v) para obtener una concentración de $0,16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ del anticuerpo en la solución de reducción. La concentración de TCEP era de 0,1 M, la proporción del ácido fórmico en la solución era de 0,5 % (peso/volumen). La incubación se llevó a cabo en presencia de ácido fórmico y TCEP durante 10 min. a 70°C . Subsiguientemente, la solución del anticuerpo que se obtuvo se centrifugó durante 2 min. a 13.400 rpm (Minispin, Eppendorf). Se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se transfirió a un tubo analítico. Se aplicaron $13 \mu\text{l}$ ($2 \mu\text{g}$) del anticuerpo a la columna en el experimento LC/MS (figura 9).

Procedimiento de separación mediante RP-HPLC

10 La separación mediante RP de las preparaciones se llevó a cabo en un sistema Agilent 1100 Cap-LC equipado con un microdesgasificador, una bomba capilar, un microautomuestreador con una unidad de control de la temperatura, un horno de columna y un detector de múltiples longitudes de onda (Agilent, Waldbronn). Se utilizó una columna Júpiter C18 (Phenomenex, Aschaffenburg) de $3,5 \mu\text{m}$ de tamaño de las partículas, un tamaño del poro de 300 Å y que tiene unas dimensiones de $1,0 \times 250 \text{ mm}$ para la separación estándar, que representa el punto de referencia. La separación cromatográfica se llevó a cabo a 75°C y a una velocidad de flujo de $40 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Se aplicaron dos μg del anticuerpo en la columna para cada preparación. Los componentes de la muestra se eluyeron con un gradiente binario que se mezcló a partir del eluyente A (ácido fórmico al 0,5 % en H_2O (v/v)) y el eluyente B (2-propanol al 70 %, acetonitrilo al 20 %, H_2O al 9,5 % y ácido fórmico al 0,5 % (v/v)). La tabla 7 muestra el perfil del gradiente utilizado en la elución.

Tabla 7: perfil del gradiente para el tiempo de separación mediante RP

Tiempo [min.]	Eluyente B [%]	Pendiente [eluyente B $\cdot \text{min}^{-1}$]
0	20	-
7	20	0
9	25	2,50
29	50	1,25
32	100	16,67
37	100	0
38	20	-80
50	20	0

25 Los componentes de la muestra eluidos se detectaron con la ayuda de un detector UV a una longitud de onda de 280 nm. Para el análisis de masas TOF *online*, se acopló el sistema HPLC con un espectrómetro de masas LCT para micromasas (Waters, Eschborn). Se registró un valor blanco mediante la inyección de $10 \mu\text{l}$ del eluyente A.

Análisis espectrométrico de masas

30 El análisis de masas ESI-TOF *online* del eluyente de la separación por LC se llevó a cabo en un espectrómetro de masas LCT para micromasas (Waters, Eschborn) que estaba equipado con una fuente de de iones en electropulverización. Los datos se registraron dentro de un intervalo de masa de entre 600-2000 UMA (unidades de masa atómica) en el modo positivo (ES+) a una temperatura del cono de 80°C y a una temperatura de desolvatación de 100°C . El voltaje capilar fue de 3000 V, el voltaje del cono fue de 30 V, el voltaje de las lentes RF fue de 400 V y el voltaje del cono de extracción fue de 1 V. Los otros ajustes de los parámetros para el análisis de masas ESI-TOF se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Ajustes de los parámetros del espectrómetro de masas LCT

Parámetro	Ajustes
Apertura (V)	2,0
Aceleración (V)	200
Foco (V)	0,0
Dirección (V)	0,7
Energía iónica (V)	29,0
Lente del tubo (V)	28,0
Tubo de vuelo TOF (V)	4600,0
Reflectrón (V)	1770,0

Flujo de gas del cono (l/h.)	64
Flujo de gas de desolvatación (l/h.)	392
Resolución	4000,0
Masa de bloqueo	0,0000
Ventana de masa +/-	1,0000

La calibración de un punto (determinación LTeff) se llevó a cabo utilizando H3PO4 al 0,085 % en acetonitrilo al 50 %, que se introdujo en el espectrómetro de masas a una velocidad de flujo de 5 µl·min⁻¹ con la ayuda de una bomba Hamilton (bomba 11, Harvard Apparatus). La precisión de la masa fue de ~ 100 ppm. Los datos se evaluaron con la ayuda del programa de registro de datos Mass Lynx 4.0.

Ejemplo 6

Comparación de los espectros de masa de la columna Pursuit de difenilo con los de la columna Júpiter C18

Del mismo modo que con la columna Júpiter C18, la columna Pursuit de difenilo sólo permitió una separación parcial de las especies oxidadas de HC-Fc (23.778 Da) en un hombro previo al pico 1 (cf. figura 8). Tampoco se consiguió mejora alguna en la separación para la especie de piroglutamato de la cadena ligera del anticuerpo. Ésta eluyó en la columna Júpiter C18, así como en la columna Pursuit de difenilo, en el pico 3a con una resolución comparable. El fragmento HC-Fab (aminoácidos (AA) 1-220) también coeluyó en las dos columnas junto a la especie intacta de HC-Fab en el último pico del perfil de elución. De este modo, tampoco fue posible separar este fragmento en un pico discreto de la separación utilizando la columna Pursuit de difenilo. Una comparación de los perfiles de masa de las columnas Júpiter C18 y Pursuit de difenilo mostró adicionalmente que la masa del pico 3b de la columna Pursuit de difenilo se correlaciona con el pico 4 de la columna Júpiter. Ambas mostraron una masa de 33.630 Da, que puede asignarse a la enzima IdeS. Además, el pico 5 de la columna Pursuit de difenilo se correlaciona con el pico 5 de la columna Júpiter C18. En ambos casos, aparecen la masa del complejo HC-Fab-LC que contiene tioéter (48.918 Da), la masa del fragmento HC-Fab reducido incompletamente (25.377 Da) y la masa de la N-glucosidasa F (34.783 Da).

En contraste, el pico 4 de la columna Pursuit de difenilo no se correlaciona con ningún pico de la columna Júpiter C18 y, por consiguiente, constituye una diferencia en el perfil de elución de la columna Júpiter C18. Este pico muestra una masa de 48.916 Da que puede asignarse a la especie de tioéter y la masa 49.118 Da. Esta masa se corresponde al peso molecular de la cadena pesada del anticuerpo. Así, la masa de 49.118 Da representa la cadena pesada intacta del anticuerpo, que se escinde mediante IdeS, que se ha separado de la molécula de anticuerpo restante mediante reducción durante el curso de la preparación de la muestra.

Las diferencias en la comparación de los perfiles de elución de las dos columnas también se observan en el caso del pico 1a, que no se detecta en el perfil de elución de la columna Júpiter C18. En el pico 1a de la columna Pursuit de difenilo se separa una especie que tiene una masa de 20.037 Da. Es posible asignarla al fragmento HC que se ha formado como resultado de una escisión Asp-Pro entre el ácido aspártico 271 (D271) y la prolina 272 (P272). La masa teórica del fragmento C-terminal de la escisión Asp-Pro tiene un valor de 20.033 Da. Dado que esta masa aparece en el espectro de masa del anticuerpo bajo estrés, así como en el espectro de masa del anticuerpo sin estrés, este producto de escisión no es un producto de degradación obtenido como resultado de la incubación a 40°C, sin embargo es un producto de degradación del anticuerpo que sólo puede separarse con la columna Pursuit de difenilo. En el caso de la columna Júpiter C18, este fragmento aparece junto a la especie oxidada en el hombro del pico 1, lo que indica un mejor rendimiento de separación para la columna Pursuit de difenilo.

Una comparación entre las columnas de difenilo Pursuit y Júpiter C18 muestra que la columna Pursuit de difenilo tiene unas propiedades de separación mejores que las de la columna Júpiter C18, en aspectos particulares (cf. picos 1a y 4) y tiene unos resultados comparables en otros sentidos. De este modo, fue posible mejorar efectivamente la separación de las especies del anticuerpo.

Listado de secuencias

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Ensayo de estabilidad de anticuerpos
- <130> 24549 WO
- <150> EP 07024863.8
- 10 <151> 21-12-2007
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1
- <211> 339
- <212> PRT
- <213> Streptococcus pyogenes
- 20 <400> 1

```

Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
 1          5          10          15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
 20          25          30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
 35          40          45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
 50          55          60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
 65          70          75          80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
 85          90          95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
 100         105         110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
 115         120         125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
 130         135         140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
 145         150         155         160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
 165         170         175
    
```

ES 2 388 017 T3

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
 180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
 195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
 210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
 225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
 245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
 260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
 275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
 290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
 305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
 325 330 335

Gln Thr Asn

5 <210> 2
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Flavobacterium ameridies
 <400> 2

Ala Pro Ala Asp Asn Thr Val Asn Ile Lys Thr Phe Asp Lys Val Lys
 1 5 10 15

Asn Ala Phe Gly Asp Gly Leu Ser Gln Ser Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 20 25 30

Phe Pro Ala Asp Val Thr Ala Val Lys Thr Ile Lys Met Phe Ile Lys
 35 40 45

10

ES 2 388 017 T3

Asn Glu Cys Pro Asn Lys Thr Cys Asp Glu Trp Asp Arg Tyr Ala Asn
 50 55 60

Val Tyr Val Lys Asn Lys Thr Thr Gly Glu Trp Tyr Glu Ile Gly Arg
 65 70 75 80

Phe Ile Thr Pro Tyr Trp Val Gly Thr Glu Lys Leu Pro Arg Gly Leu
 85 90 95

Glu Ile Asp Val Thr Asp Phe Lys Ser Leu Leu Ser Gly Asn Thr Glu
 100 105 110

Leu Lys Ile Tyr Thr Glu Thr Trp Leu Ala Lys Gly Arg Glu Tyr Ser
 115 120 125

Val Asp Phe Asp Ile Val Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr Lys Tyr Ser Ala
 130 135 140

Val Val Pro Val Val Gln Tyr Asn Lys Ser Ser Ile Asp Gly Val Pro
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Ala His Thr Leu Ala Leu Lys Lys Asn Ile Gln Leu Pro
 165 170 175

Thr Asn Thr Glu Lys Ala Tyr Leu Arg Thr Thr Ile Ser Gly Trp Gly
 180 185 190

His Ala Lys Pro Tyr Asp Ala Gly Ser Arg Gly Cys Ala Glu Trp Cys
 195 200 205

Phe Arg Thr His Thr Ile Ala Ile Asn Asn Ser Asn Thr Phe Gln His
 210 215 220

Gln Leu Gly Ala Leu Gly Cys Ser Ala Asn Pro Ile Asn Asn Gln Ser
 225 230 235 240

Pro Gly Asn Trp Thr Pro Asp Arg Ala Gly Trp Cys Pro Gly Met Ala
 245 250 255

Val Pro Thr Arg Ile Asp Val Leu Asn Asn Ser Leu Ile Gly Ser Thr
 260 265 270

Phe Ser Tyr Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Trp Thr Asn Asn Gly Thr Asn
 275 280 285

Gly Asp Ala Phe Tyr Ala Ile Ser Ser Phe Val Ile Ala Lys Ser Asn
 290 295 300

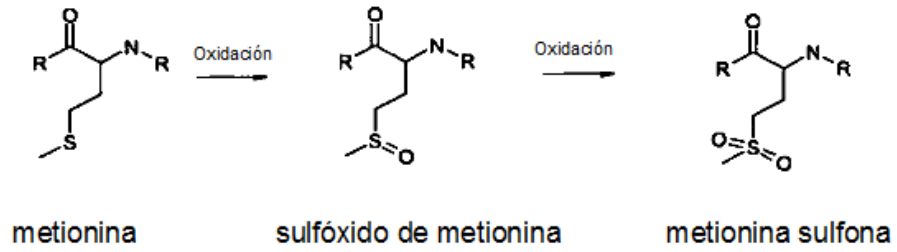
Thr Pro Ile Ser Ala Pro Val Val Thr Asn
 305 310

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección de anticuerpos IgG y de fragmentos de anticuerpo IgG en una muestra, caracterizado de manera que incluye los siguientes pasos *in vitro*:
- a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo IgG y/o fragmentos de anticuerpo IgG
- b) incubar la muestra proporcionada según a) con
- 10 iv) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG,
- v) N-glucosidasa F,
- 15 vi) el agente reductor tricloroetilfosfato y ácido fórmico
- donde la incubación en los pasos b)-i), b)-ii) y b)-iii) es secuencial,
- c) analizar la muestra incubada según b) mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas para detectar el anticuerpo intacto y/o para detectar fragmentos del anticuerpo contenidos en la muestra que se proporciona según a).
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado de modo que la proteasa de cisteína específica para IgG tiene la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°: 1.
- 25 3. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-2, caracterizado de modo que la glucosidasa tiene la secuencia de aminoácidos Id. de Sec. N°: 2.
4. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado de modo que la cromatografía líquida es una cromatografía líquida de fase reversa.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado de modo que la cromatografía emplea un material de cromatografía con residuos C8 o C18.
- 35 6. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, caracterizado de modo que la cromatografía líquida es una cromatografía de interacción hidrofóbica.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado de modo que la cromatografía de interacción hidrofóbica emplea un material de cromatografía con residuos de difenilo.
- 40 8. La utilización de la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG procedente de *Streptococcus pyogenes* para la detección de anticuerpos IgG y de fragmentos de anticuerpo IgG en una muestra, caracterizado de modo que la muestra se incuba con la proteasa de cisteína específica para IgG y, después de la incubación con la N-glucosidasa F procedente de *Flavobacterium meningosepticum*, el agente reductor tricloroetilfosfato y el ácido fórmico, los fragmentos obtenidos se analizan mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas.
- 45 9. Un kit para la detección de anticuerpos IgG y de fragmentos de anticuerpo IgG, caracterizado de modo que el kit contiene
- 50 i) la proteasa de cisteína IdeS específica para IgG procedente de *S. pyogenes*,
- ii) la glucosidasa N-glucosidasa F procedente de *Flavobacterium meningosepticum*, y
- iii) tricloroetilfosfato y ácido fórmico.

Fig. 1

a)



b)

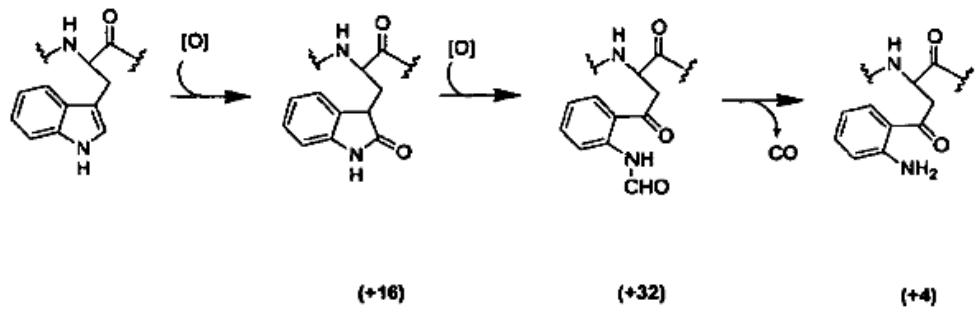


Fig. 2

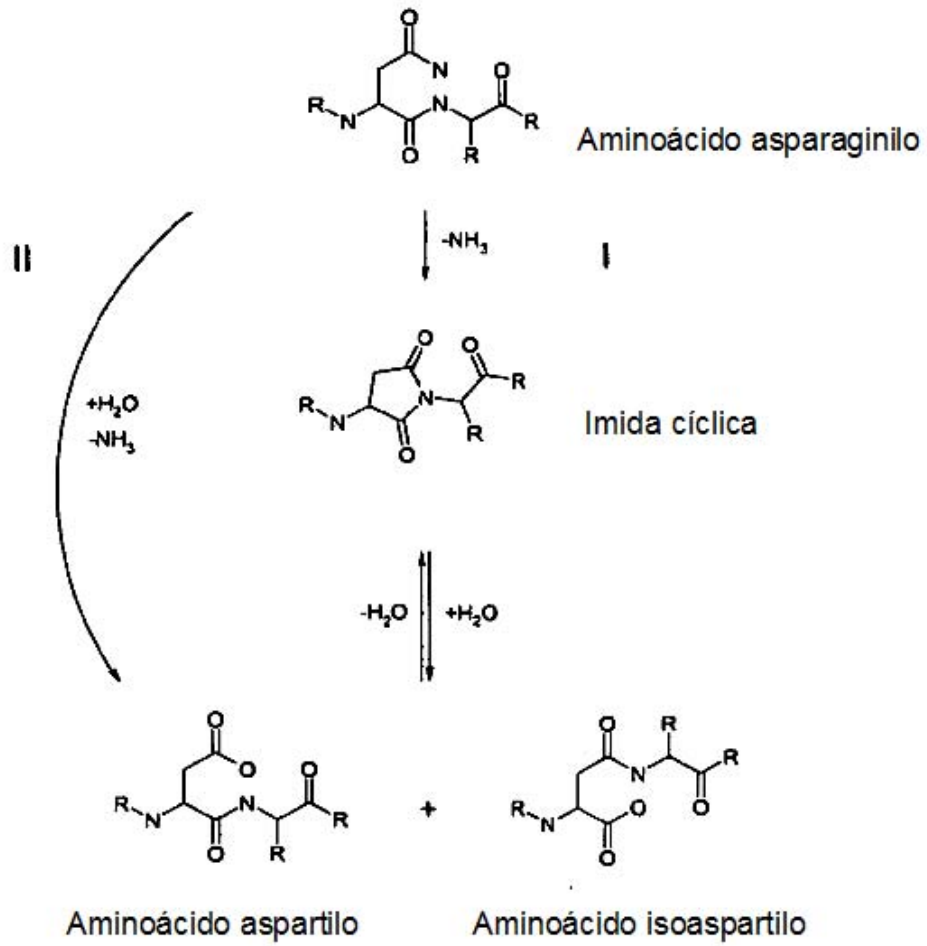


Fig. 3

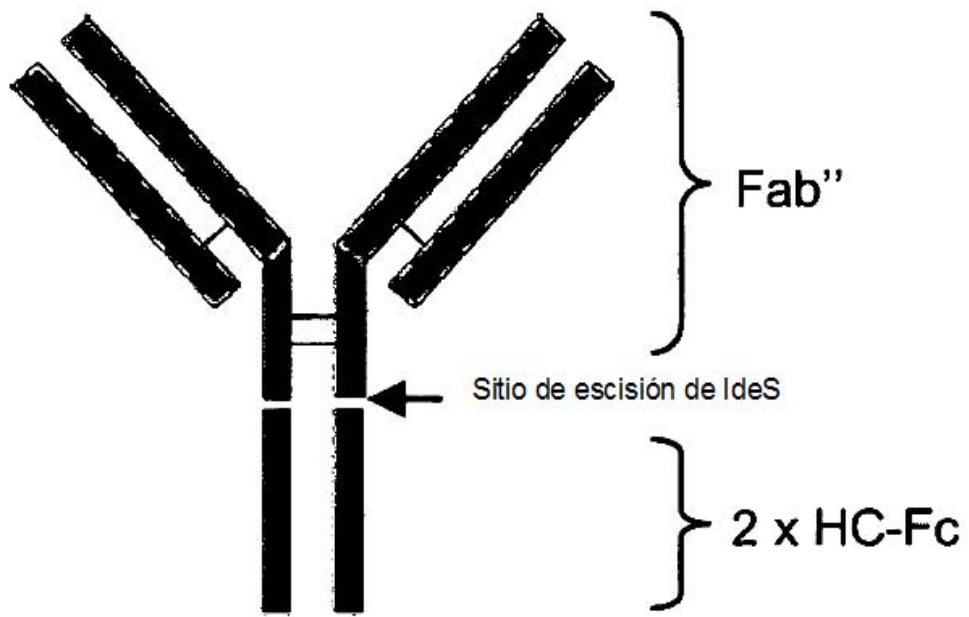


Fig. 4

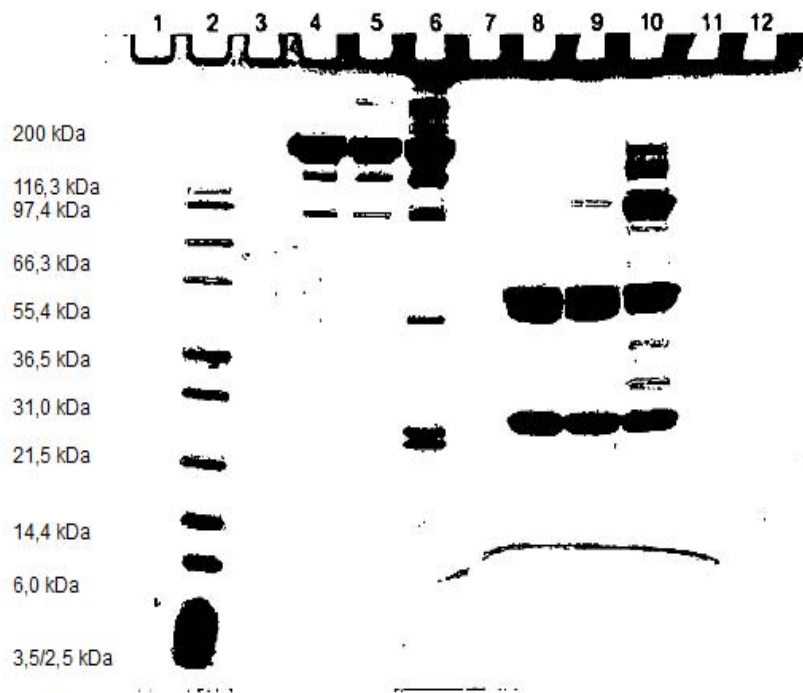


Fig. 5

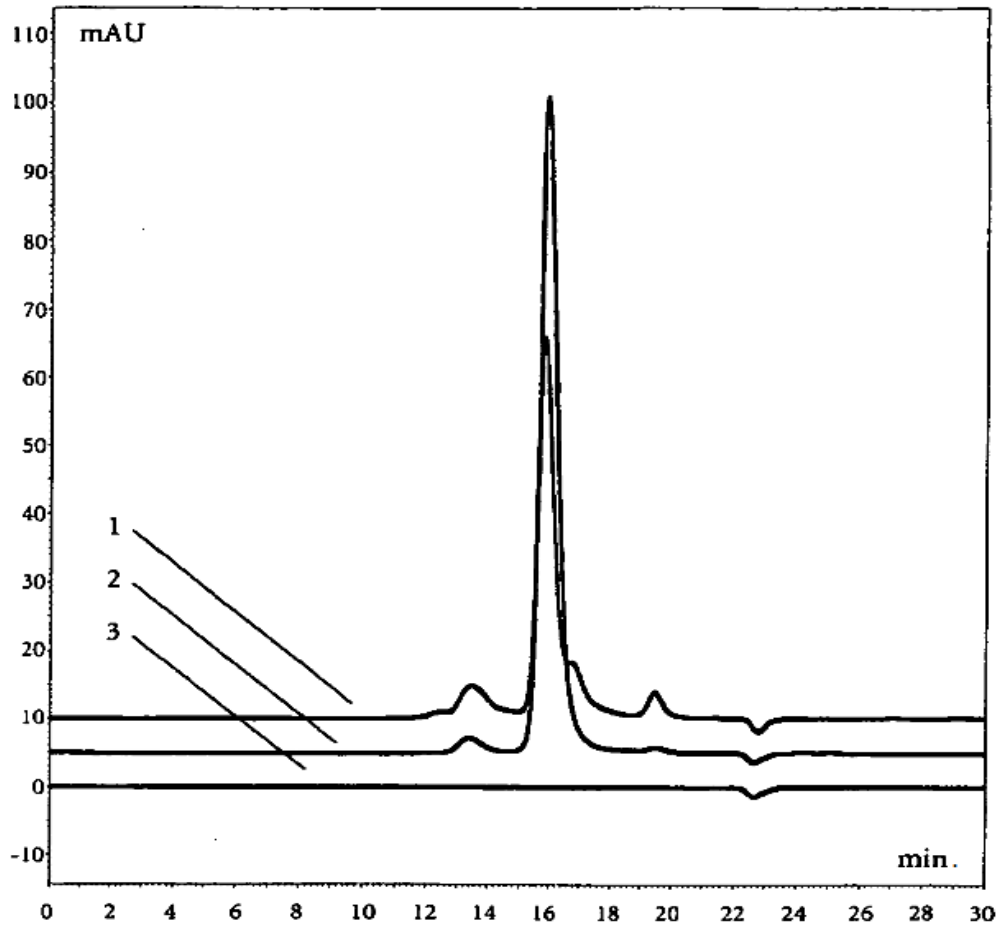


Fig. 6

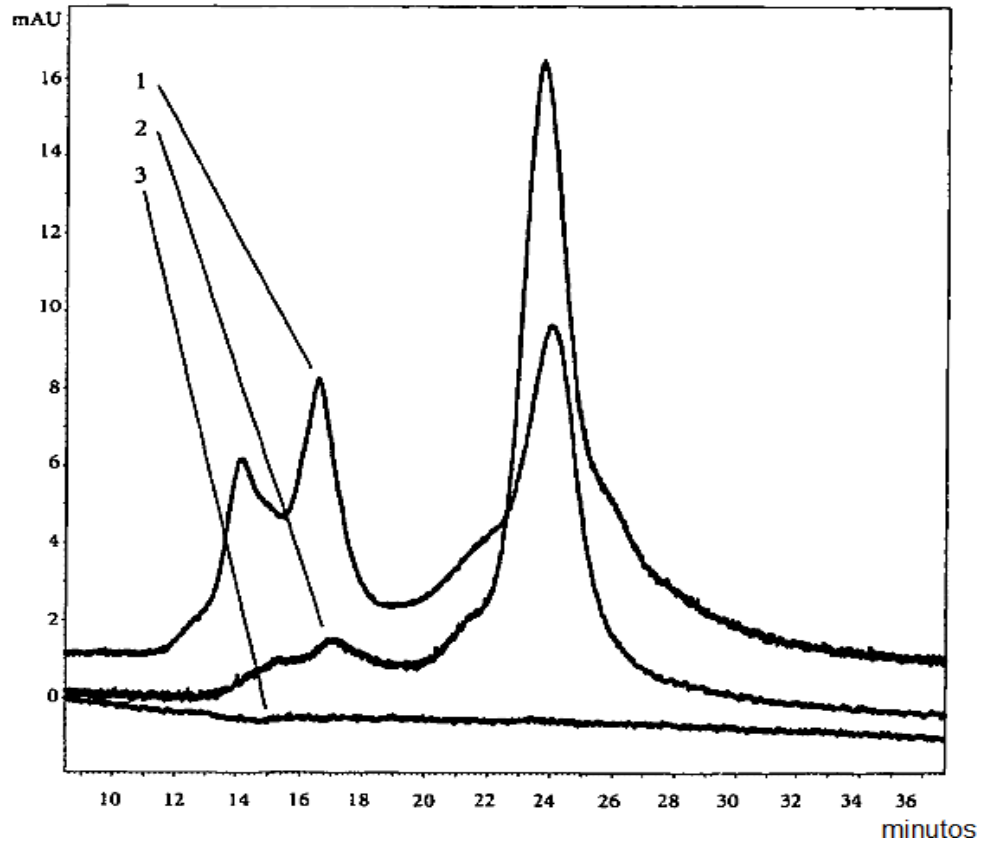


Fig. 7

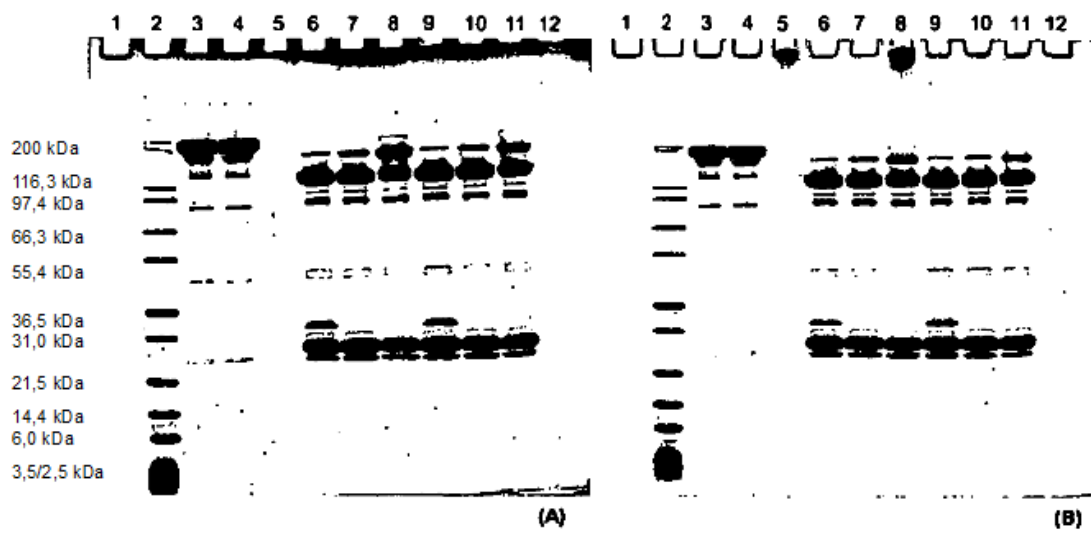


Fig. 8

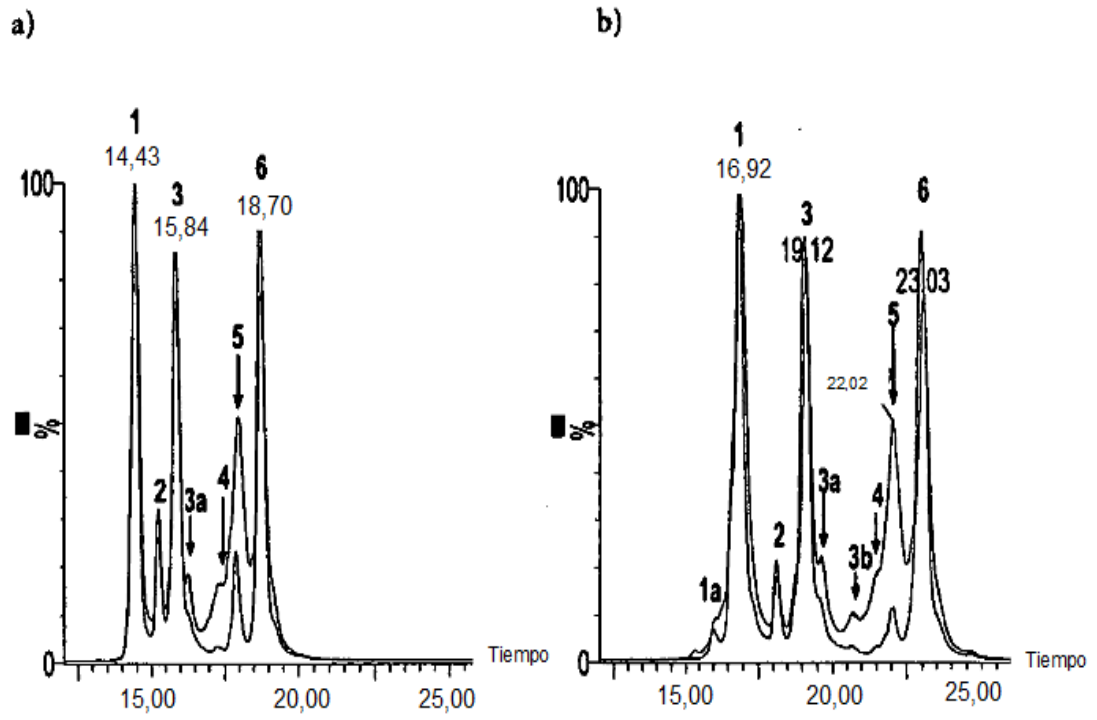


Fig. 9

