

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 321**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010 E 10757221 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2483693**

54 Título: **Detección de a-fucosilación en anticuerpos**

30 Prioridad:

02.10.2009 EP 09172130

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

06.02.2015

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**JAEGER, CHRISTIANE;
KOLL, HANS;
SONDERMANN, PETER y
UMANA, PABLO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 528 321 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

Detección de a-fucosilación en anticuerpos

- 5 La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpo glucosilado o un fragmento del mismo.

Antecedentes

- 10 Aunque las regiones variables dentro de los dominios Fab (fragmentos de unión a antígeno) de los anticuerpos son responsables del reconocimiento del antígeno, la región Fc (fragmento cristalizante) representa una parte invariante del anticuerpo que es responsable de la mediación de las funciones efectoras. En el caso de la inmunoglobulina G (IgG), entre estas se incluyen la fijación del complemento y la unión a receptores de Fcγ (FcγR). La presencia de un oligosacárido unido a N en un único sitio conservado (Asn297) dentro del dominio CH2 del fragmento
- 15 homodimérico es obligatoria para la mediación de estas dos funciones efectoras. Se ha descubierto sólo recientemente que la modificación de los carbohidratos unidos también puede presentar un efecto de mejora de la afinidad para la interacción entre FcγRIIIa e IgG. La modificación de carbohidrato responsable de dicho efecto es la ausencia de un residuo de fucosa que habitualmente se encuentra unido al primer residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) en el glicano complejo biantenarico de IgG (figura 1).

- 20 Ha podido demostrarse en experimentos *in vivo* e *in vitro* que dicha afinidad incrementada resulta en una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, mediada principalmente por células asesinas naturales (NK). En consecuencia, también se cree que dichos anticuerpos a-fucosilados presentan una eficacia mejorada en tratamientos destinados a erradicar las células opsonizadas.

- 25 La generación de anticuerpos a-fucosilados representa un importante reto biotecnológico que puede conseguirse mediante varios métodos. Aunque las líneas celulares con eliminación completa de los enzimas participantes en la biosíntesis de la fucosilación (por ejemplo mediante inactivación génica) pueden rendir anticuerpos cuantitativamente a-fucosilados, la mayoría de los demás métodos no pueden. Por ejemplo, el tratamiento con ARNip o el cocultivo de células expresantes de anticuerpos con kifunensina (Zhou *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 99:652-665, 2008), así como la modificación de los carbohidratos por la N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), que estimula la formación de oligosacáridos bisectados, inhibiendo en consecuencia la reacción de fucosilación (Umana *et al.*, Nat. Biotech. 17:176-180, 1999), conduce a anticuerpos sólo parcialmente a-fucosilados.

- 35 Estos anticuerpos parcialmente a-fucosilados pueden mostrar principalmente una distribución heterogénea de la a-fucosilación dentro de un grupo de anticuerpos. Por ejemplo, las tasas de fucosilación pueden ser diferentes durante la fermentación. Además, el suceso de fucosilación podría ser cooperativo, es decir, la segunda fucosilación en el anticuerpo homodimérico podría producirse a una tasa incrementada (cooperatividad positiva) o reducida (cooperatividad negativa) en comparación con la primera.

- 40 El complejo FcγRIIIa/IgG presenta una estequiometría 1:1 pero IgG presenta dos sitios de unión para FcγRIIIa. En consecuencia, en un único anticuerpo a-fucosilado, el receptor puede unirse con elevada afinidad al sitio de unión formado por el glicano a-fucosilado de la IgG y el núcleo de la proteína o con baja afinidad al sitio de unión que consiste del carbohidrato fucosilado y el núcleo de la proteína. Por lo tanto, puede concluirse que un grupo de
- 45 anticuerpos con una a-fucosilación de 50% podría consistir de una población homogénea de anticuerpos en la que únicamente uno de los dos N-glicanos se encuentra fucosilado, o 50% de anticuerpos en los que ambos N-glicanos se encuentran fucosilados mientras que en el otro 50% ninguno de los N-glicanos se encuentra fucosilado. Resulta evidente que esta división diferencial de la a-fucosilación influye sobre la afinidad global para FcγRIIIa y resulta en una actividad biológica diferente. Por lo tanto, resulta obligatorio analizar la actividad biológica de dicha preparación de anticuerpos de manera directa mediante la utilización de un sistema de ensayo biológico (bioensayo) o indirectamente mediante la medición bioquímica de la tasa y distribución de la a-fucosilación, lo que rinde un resultado más exacto.

- 55 La glucoanalítica actual del estado de la técnica utiliza la N-glucosidasa F (PNGasa F) de *Flavobacterium meningosepticum* para escindir los carbohidratos unidos a N con un análisis posterior de EM MALDI (espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz) (según Papac *et al.*, Glycobiology 8:445-454, 1998). El documento n° US 2007/0166306 muestra el análisis del estado de fucosilación de un anticuerpo mediante la digestión con PNGasa F y EndoH, que libera los oligosacáridos del polipéptido antes del análisis mediante EM. Sin embargo, mediante la utilización de dicho procedimiento se pierde la información de los enlaces y no resulta posible
- 60 determinar la distribución de la fucosilación dentro de una preparación de anticuerpos.

Por otra parte, el análisis del anticuerpo completo utilizando EM-IEP (espectrometría de masas-ionización por electropulverización) rinde patrones de masas complejos que no permiten una interpretación cuantitativa debido a

las diversas modificaciones aparte de la fucosilación, como la galactosilación, la heterogeneidad de la lisina C-terminal, la desamidación, etc., que pueden producirse o no en ambas subunidades de la IgG homodimérica.

5 Por lo tanto, existe una necesidad de un nuevo método analítico que elimine la heterogeneidad mencionada pero que mantenga la información de los enlaces.

Descripción de la invención

10 Las desventajas anteriormente indicadas son superadas por la presente invención, que proporciona métodos para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpos glucosilado. Preferentemente, se determina la cantidad de residuos de fucosa y su patrón de distribución dentro de un anticuerpo o de un fragmento del mismo. El análisis de la distribución de residuos de fucosa por cada molécula de Fc en una preparación de anticuerpos también es parte de la presente invención. Además, la presente invención puede utilizarse para la determinación de fucosilación cooperativa en una preparación de anticuerpos durante la fermentación. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método que llena un vacío en el análisis de los anticuerpos. Con el conocimiento de los patrones de fucosilación en un anticuerpo o fragmento del mismo obtenido mediante este nuevo método, ahora resulta posible una predicción más exacta de la potencia mediada por Fc.

20 Inesperadamente, los inventores de la presente invención han encontrado que Endo S (un enzima con actividad de endoglucosidasa, originalmente identificado en *Streptococcus pyogenes* (Collin y Olsen, EMBO J. 20:3046-3055, 2001) corta las fracciones de glicano complejo de la región Fc de la IgG humana, dejando únicamente el primer residuo de GlcNAc al que puede unirse un residuo de fucosa. Los carbohidratos de tipo híbrido que son discriminados (no cortados) por Endo S pueden cortarse cuantitativamente en el mismo sitio por endoglucosidasa H (Endo H). La combinación de ambas enzimas permite de esta manera la preparación de una proteína uniformemente glucosilada que sólo varía por el contenido de fucosa. El análisis de dichos fragmentos de Fc tratados no sólo permite la determinación del contenido de fucosa sino también la determinación de la distribución de los residuos de fucosa dentro del grupo de anticuerpos analizado. Estos nuevos resultados cierran un vacío analítico y podrían permitir una estimación de la potencia del anticuerpo analizado en términos de su eficacia en la inducción de la ADCC.

30 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpo glucosilado o de un fragmento del mismo, que comprende las etapas siguientes:

- 35 a) eliminación enzimática de residuos sacáridos heterogéneos de la proteína,
 - b) eliminación enzimática de otros residuos heterogéneos de la proteína,
 - c) posterior análisis de la proteína,
- en las que la eliminación en la etapa a) se lleva a cabo mediante Endo S y Endo H.

40 En una realización, la etapa c) de dicho método comprende además una etapa de purificación antes del análisis. En una realización específica, la purificación se consigue mediante cromatografía de afinidad o mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía de afinidad puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, proteína A o proteína G.

45 En una realización, la proteína que debe tratarse y analizarse mediante el método de la invención es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgG. Dicho fragmento de anticuerpo preferentemente es un fragmento de Fc, en particular un fragmento de Fc de un anticuerpo de tipo IgG.

50 La eliminación de la etapa a) es realizada por uno o más enzimas que cortan específicamente los carbohidratos unidos a N de tipo complejo o de tipo híbrido. Según la invención, dichos enzimas comprenden Endo S y Endo H.

En otra realización específica, la eliminación en la etapa b) es realizada por uno o más enzimas. Preferentemente, dichos enzimas comprenden plasmina y/o carboxipeptidasa B.

55 En una realización específica adicional, el análisis de la etapa c) comprende el análisis de EC-PM SDS (electroforesis capilar-peso molecular de dodecilsulfato sódico), el análisis de EM-IEP o la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), o una combinación de las mismas.

60 En una realización preferente, la etapa a) del método anteriormente descrito comprende la escisión de los sacáridos heterogéneos de las estructuras de carbohidrato de la proteína posteriores al primer residuo de GlcNAc de dichas estructuras, dejando de esta manera el residuo de fucosa unido al núcleo de anticuerpo. Esta etapa puede llevarse a cabo con dos enzimas que cortan específicamente los carbohidratos unidos a N de tipo complejo o de tipo híbrido que frecuentemente se encuentran presentes en los anticuerpos producidos biotecnológicamente, según la invención Endo S y Endo H.

En otra realización preferente, la etapa b) del método anteriormente descrito comprende la eliminación cuantitativa de residuos de lisina C-terminales de la cadena pesada del anticuerpo, preferentemente utilizando un enzima, comprendiendo el enzima preferentemente carboxipeptidasa B.

5 En otra realización preferente, la etapa b) del método anteriormente descrito comprende el corte entre el fragmento Fab y el fragmento Fc de un anticuerpo. Preferentemente los puentes disulfuro covalentes entre cadenas dentro del péptido bisagra de las cadenas pesadas se mantienen dentro del fragmento Fc tras el corte entre los fragmentos Fab y Fc. Preferentemente el corte se consigue con un enzima. Preferentemente dicho enzima comprende plasmina.

10 En una realización preferente, la etapa c) del método anteriormente descrito comprende el análisis de la molécula de anticuerpo o fragmento Fc tratado mediante CL-EM sin ninguna etapa de purificación previa. Dicho análisis normalmente rinde únicamente tres masas que corresponden a proteínas con dos glicanos fucosilados, proteínas con un glicano fucosilado y un glicano a-fucosilado, y proteínas en las que ambos glicanos se encuentran a-fucosilados.

15 En otra realización preferente, la etapa c) del método anteriormente descrito comprende purificar la molécula de anticuerpo o fragmento Fc tratada utilizando métodos estándares y el análisis de la misma mediante análisis de EM-IEP. Dicho análisis normalmente rinde únicamente tres masas que corresponden a proteínas con dos glicanos fucosilados, proteínas con un glicano fucosilado y un glicano a-fucosilado, y proteínas en las que ambos glicanos se encuentran a-fucosilados.

20 En una realización, el método de la invención comprende las etapas siguientes: proporcionar una preparación de anticuerpos, aislar opcionalmente la parte de fragmento Fc de dicha preparación de anticuerpos, eliminar todos los residuos de sacárido heterogéneos de dicho anticuerpo o fragmento Fc con Endo H y Endo S, eliminar los residuos de lisina C-terminales de dicho anticuerpo o fragmento Fc con carboxipeptidasa B, y el análisis del anticuerpo o fragmento Fc tratado, mediante EM-IEP, CL-EM o análisis de EC-PM SDS.

25 En otra realización, dicho método comprende las etapas siguientes: proporcionar una preparación de anticuerpos, aislar opcionalmente la parte de fragmento Fc de dicha preparación de anticuerpos utilizando plasmina, eliminar todos los residuos de sacárido heterogéneos de dicho anticuerpo o fragmento Fc con Endo H y Endo S, eliminar los residuos de lisina C-terminales de dicho anticuerpo o fragmento Fc con carboxipeptidasa B, y la purificación y el análisis del anticuerpo o fragmento Fc tratado, mediante EM-IEP, CL-EM o análisis de EC-PM SDS.

30 En todavía otra realización, la exposición se refiere a kits adecuados para llevar a cabo un ensayo que detecta la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de una glucoproteína. Los kits de la presente invención comprenden todos los componentes a los que se hace referencia en los métodos descritos anteriormente (por ejemplo Endo H, Endo S, carboxipeptidasa B, plasmina, tampones adecuados), instrucciones que indican un procedimiento según cualquiera de los métodos descritos anteriormente y un recipiente para el contenido del kit.

35 En un aspecto, la invención proporciona un kit para la utilización en la detección cualitativa y cuantitativa de residuos de fucosa en un péptido, que comprende Endo S, Endo H, plasmina, carboxipeptidasa B, instrucciones que proporcionan un procedimiento según cualquiera de los métodos de la invención y un recipiente para el contenido del kit.

40 Se da a conocer además la utilización de Endo S para el corte de los oligosacáridos complejos unidos a N de una glucoproteína, preferentemente un anticuerpo glucosilado o un fragmento del mismo.

45 La invención proporciona la utilización de Endo S para el corte de oligosacáridos complejos a partir de una glucoproteína en un método para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpo glucosilado o un fragmento del mismo según la invención.

Definiciones

55 Los términos utilizados en la presente memoria se utilizan de la manera generalmente utilizada en la técnica, a menos que se definan de otra manera a continuación:

60 La expresión "sacárido heterogéneo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye cualquier fracción monosacárido de un anticuerpo glucosilado o fragmento de anticuerpo que no se encuentra conectado a un residuo de fucosa. Son ejemplos no limitativos de sacáridos heterogéneos de un anticuerpo glucosilado o fragmento de anticuerpo, la manosa, el sialato, la galactosa y la acetilglucosamina. Generalmente los sacáridos heterogéneos que se eliminan en la etapa a) del método según la invención son todos los sacáridos aparte del primer residuo de

GlcNAc, es decir, el residuo de GlcNAc unido a un residuo de asparagina de la proteína y el residuo de fucosa unido a dicho primer residuo de GlcNAc.

5 La expresión "residuos heterogéneos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier otra fracción de un anticuerpo glucosilado o fragmento de anticuerpo (aparte de los sacáridos heterogéneos) que podría interferir con la detección de residuos de fucosa dentro de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Son ejemplos no limitativos de residuos heterogéneos, diversas modificaciones del anticuerpo o fragmento de anticuerpo glucosilado aparte de la fucosilación, tales como la galactosilación, la heterogeneidad de las lisinas C-terminales y la desamidación. La expresión "residuos heterogéneos" puede incluir además fragmentos de anticuerpo que no se encuentran glucosilados, por ejemplo el fragmento Fab, el fragmento scFv y otros fragmentos.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" pretende incluir moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpo o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

15 Las expresiones "oligosacárido complejo" y "oligosacárido híbrido" se refieren al patrón de glucosilación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En la figura 7 se muestran ejemplos no limitativos de "oligosacárido complejo" y "oligosacárido híbrido". Tal como entenderá el experto en la materia, las glucoproteínas enriquecidas en oligosacáridos híbridos bisectados típicamente resultan de la sobreexpresión de GnT-III en las líneas celulares de producción. En la figura 7-III se detallan estructuras ejemplares de oligosacáridos híbridos bisectados. Las glucoproteínas enriquecidas en oligosacáridos complejos bisectados típicamente resultan de una coexpresión de ManII y GnT-III en las líneas celulares de producción. En la figura 7-IV se detallan estructuras ejemplares de oligosacáridos complejos bisectados (Ferrara *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 93:851-861, 2006).

20 El corte "después de" un residuo sacárido, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al corte distalmente a dicho residuo, es decir, el corte del enlace sacárido que une dicho residuo al contiguo hacia el extremo externo de la estructura de carbohidrato. El corte "después del primer residuo de GlcNAc" de un glicano unido a N se refiere al corte del núcleo quitobiosa del oligosacárido entre el primer (es decir el unido al residuo de asparagina) y el segundo (es decir, el unido al primer) residuo de GlcNAc.

25 El término "distribución" referido a los residuos de fucosa en una preparación de anticuerpos se refiere a la presencia en esa preparación de moléculas de anticuerpo o de Fc que son diferentes en el número de residuos de fucosa asociados con los glicanos unidos mediante N en la región de Fc. Por ejemplo, una molécula de IgG presenta dos glicanos unidos mediante N en su región de Fc, cada uno de los cuales puede presentar un residuo de fucosa unido al primer residuo de GlcNAc de la estructura de carbohidrato. De esta manera, en una preparación de IgG pueden existir tres especies moleculares diferentes: IgG con dos, uno o ningún residuo de fucosa asociado a los glicanos unidos mediante N en la región de Fc. La proporción entre estas diferentes especies (es decir, la distribución de los residuos de fucosa en cada molécula de Fc) puede determinarse mediante el método de la invención, además de determinar el contenido total de fucosas, es decir, la fracción de N-glicanos fucosilados o a-fucosilados.

30 Los ejemplos proporcionados posteriormente explican la invención en mayor detalle. Los ejemplos se proporcionan a fin de permitir que el experto en la materia entienda y ponga en práctica más fácilmente la invención. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada en su alcance a las realizaciones ejemplificadas, las cuales pretenden ser ilustraciones de únicamente aspectos individuales de la invención, y los métodos que son funcionalmente equivalentes se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención.

Breve descripción de las figuras

35 FIGURA 1. Representación esquemática de una fracción carbohidrato unida a Asn-297 de la IgG1-Fc humana. Los azúcares en negrita definen el núcleo pentasacárido de las estructuras de glicano unidas mediante N; la adición de los demás residuos sacáridos es variable. En gris se representa una estructura de GlcNAc bisectada.

40 FIGURA 2. Desglucosilación de fragmento Fc intacto de anticuerpos A (de tipo salvaje) y C (glucomanipulados), seguida mediante EC-SDS. Se muestran electroferogramas de fragmentos Fc no reducidos antes y después del tratamiento enzimático. (A) Fragmento Fc de anticuerpo C sin tratamiento enzimático (línea discontinua) y desglucosilado con PNGasa F (línea de puntos) o Endo S (línea continua), (B) fragmento Fc de anticuerpo A sin tratamiento enzimático (línea discontinua), desglucosilado con PNGasa F (línea de puntos) o desglucosilado con Endo S (línea continua).

45 FIGURA 3. Espectro de masas de MALDI-TOF de iones positivos de los oligosacáridos unidos a N liberados del fragmento Fc del anticuerpo C mediante el tratamiento consecutivo con Endo S y PNGasa F o con Endo S y Endo H. (A) Espectro de glicanos liberados mediante tratamiento con Endo S. (B) Espectro de carbohidratos resistentes a Endo S liberados por el tratamiento posterior con PNGasa F, que resulta en una señal aislada en $m/z=1663$

(posiblemente correspondiente a estructuras híbridas o complejas, tal como se ilustra esquemáticamente). (C) Espectro de glicanos liberados por el tratamiento posterior con el enzima híbrido específico de estructura Endo H (se ilustran esquemáticamente las estructuras híbridas correspondientes a $m/z=1460$ liberadas por el tratamiento con Endo H).

5 FIGURA 4. Desglucosilación del fragmento Fc del anticuerpo C seguida mediante análisis de EC-PM de SDS (A) y espectrometría de masas MALDI-TOF de iones positivos (B). (A) Electroferogramas superpuestos del fragmento Fc no reducido sin tratamiento de glucosidasa (línea discontinua) y tratado con una combinación de Endo S y Endo H (línea continua). (B) Espectros de masas de los oligosacáridos unidos mediante N liberados del fragmento Fc tratado con Endo S y Endo H. Se ilustran esquemáticamente las estructuras híbridas correspondientes a $m/z=1460$ liberadas por Endo H.

10 FIGURA 5. Espectros de EM-IEP de fragmentos Fc tras el tratamiento con Endo S y Endo H. (A) Fragmentos Fc de anticuerpo A, (B) fragmentos Fc de anticuerpo B, (C) fragmentos Fc de anticuerpo C. Pico 1: Fc-GlcNAc/GlcNAc, pico 2: Fc-GlcNAc/GlcNAc + Fuc, pico 3: Fc-GlcNAc + Fuc/GlcNAc + Fuc.

15 FIGURA 6. Desglucosilación del anticuerpo C seguida mediante análisis de EC-SDS (A) y espectrometría de masas MALDI-TOF de iones positivos (B). (A) Se muestran los electroferogramas de IgG no reducido antes y después del tratamiento enzimático. Anticuerpo C sin tratamiento enzimático (línea discontinua) y desglucosilado con PNGasa F (línea de puntos) o tratamiento combinado de Endo S y Endo H (línea continua). (B) Espectros de masas de los oligosacáridos unidos mediante N, liberados de la IgG entera tratada con Endo S y Endo H.

20 FIGURA 7. Ruta biosintética de oligosacáridos unidos mediante N que conduce a estructuras complejas o híbridas. M1: manosidasa I, G1: β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I, G3: β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III, Gt: β 1,4-galactosiltransferasa.

25 FIGURA 8. Espectros de EM-IEP de IgG enteras tras el tratamiento con Endo S y Endo H. (A) anticuerpo A, (B) anticuerpo D. Pico 1: Fc-GlcNAc/GlcNAc, pico 2: Fc-GlcNAc/GlcNAc + Fuc, pico 3: Fc-GlcNAc + Fuc/GlcNAc + Fuc.

30 FIGURA 9. Espectros de CL-EM de IgG enteras tras el tratamiento con Endo S y Endo H. (A) anticuerpo A, (B) anticuerpo D. Pico 1: Fc-GlcNAc/GlcNAc, pico 2: Fc-GlcNAc/GlcNAc + Fuc, pico 3: Fc-GlcNAc + Fuc/GlcNAc + Fuc.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Métodos

Generación de Fc a partir de IgG humana

40 Se utilizaron cuatro IgG humanas diferentes con un contenido diferente de glicanos α -fucosilados, determinado según Papac *et al.*, 1998 (contenido entre paréntesis), para el análisis de la distribución de la α -fucosilación: anticuerpo A de tipo salvaje (2,12%), anticuerpo B glucomanipulado (47,0%), anticuerpo C glucomanipulado (69,6%) y anticuerpo D glucomanipulado (85%).

45 Las proteínas se incubaron durante 72 horas a 25°C en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM con 0,42 U de plasmina (Roche) por miligramo. Se separó el Fc escindido de los fragmentos Fab utilizando una columna de afinidad de proteína A (columna HP de proteína A HiTrap™ de 5 ml, GE Healthcare) equilibrada y lavada (5 volúmenes de columna (VC)) con *tampón A* (Tris 50 mM, pH 8,0, glicina 100 mM, NaCl 150 mM). Se eluyó Fc con pH escalonado utilizando *tampón B* (Tris 50 mM, pH 3,0, glicina 100 mM, NaCl 150 mM). Se agruparon las fracciones que contenían Fc y se neutralizaron mediante la adición de 1:40 (v/v) de Tris 2 M, pH 8,0. Se concentraron las muestras hasta un volumen de 2,5 ml utilizando ultraconcentradores (Vivaspin 15R, 10.000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02% (p/v). La proteína purificada se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

Liberación de oligosacáridos unidos mediante N, a partir de Fc humana

55 Se utilizaron diferentes enzimas para hidrolizar los glicanos unidos mediante N de IgG humanas. Los oligosacáridos unidos mediante N se cortaron a partir de 1 mg de Fc mediante incubación con 0,005 U de PNGasa F recombinante (QAbio, Vista Monte, USA). Para la liberación de los carbohidratos a partir de Fc utilizando Endo S no etiquetada (Genovis), las muestras se incubaron con una proporción molar de 1:20 de Endo S sola o en combinación con 0,1 U/mg de Endo H (QAbio). Todas las reacciones se incubaron en Tris 20 mM, pH 8,0, a 37°C durante 16 h.

Para el análisis de los carbohidratos no afectados por Endo S, se purificó el fragmento Fc tras el tratamiento con Endo S mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A y posteriormente se digirió con PNGasa F o Endo H, tal como se ha indicado anteriormente.

5 Liberación de oligosacáridos unidos mediante N, a partir de la IgG humana entera

Los glicanos unidos mediante N de IgG humana se liberaron utilizando diferentes enzimas. Los oligosacáridos unidos mediante N se cortaron a partir de 1 mg de IgG mediante incubación con 0,005 U de PNGasa F recombinante (QAbio) en Tris 20 mM, pH 8,0, a 37°C durante 16 h. Para la liberación de los carbohidratos a partir de IgG utilizando Endo S no etiquetado (Genovis), las muestras se aplicaron a una columna de desalado de NAP-5 (GE Healthcare) equilibrada con Tris 20 mM, pH 8,0. Se concentró la muestra eluida hasta una concentración final de 4 mg/ml utilizando ultraconcentradores (Amicon 5.000 MWCO, Millipore) y se incubó con una proporción molar de 1:7 de Endo S en combinación con 0,1 U/mg de Endo H (QAbio) a 37°C durante 16 h.

15 Tratamiento con carboxipeptidasa B

Para eliminar la heterogeneidad causada por los residuos de lisina C-terminal, tras la desglucosilación las muestras se incubaron adicionalmente con carboxipeptidasa B (Roche, 1 mg/ml). Por lo tanto, se añadió 1 µl de carboxipeptidasa B por cada 50 mg de Fc humana o anticuerpo entero a la reacción de endoglucosidasa y se incubó nuevamente durante 1 h a 37°C.

Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de los oligosacáridos liberados

Se analizaron los perfiles de los oligosacáridos neutros de Fc o anticuerpo entero humano mediante espectrometría de masas (Autoflex, Bruker Daltonics GmbH) en modo de iones positivos (Papac *et al.*, 1998).

Purificación de Fc o anticuerpo entero humano desglucosilado

Se separó Fc o IgG entera de los enzimas y carbohidratos cortados mediante cromatografía de afinidad de proteína A utilizando un equipo Agilent HPLC 1100 (Agilent Technologies). Se aplicaron las muestras a matriz de proteína A (Poros 20 A, Applied Biosystems) empaquetada en una precolumna C-130B de 2x20 mm (Upchurch Scientific) equilibrada con *tampón A* (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 M, pH 8,0). Tras lavar con 5,5 VC de *tampón A*, se eluyó Fc o IgG entera humana mediante pH escalonado utilizando *tampón B* (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 M, pH 3,0) en 8,3 VC. La fracción que contenía la proteína se neutralizó mediante la adición de 1:40 (v/v) de Tris 2 M, pH 8,0.

La proteína purificada posteriormente se utilizó adicionalmente para el tratamiento con enzimas para analizar los carbohidratos no cortados, el análisis de EC-SED o EM-IEP.

40 Análisis de EC-PM de SDS

Se realizó un seguimiento de la desglucosilación mediante análisis de EC-PM de SDS utilizando un equipo Beckman PA800 con detección de UV. El tampón de 100 mg de cada muestra purificada con proteína A se intercambió con Tris 20 mM, pH 8,0, utilizando concentradores giratorios (5.000 de MWCO, Millipore). Se prepararon muestras no reducidas tal como se indica en la guía SDS-MW Analyses Guide utilizando el kit de análisis SDSMW de ProteomeLab (Beckman Coulter). La concentración final de proteína era de 1 mg/ml. Se aplicaron las muestras a un capilar de sílice fusionado desnudo preacondicionado (ID de 50 mm x 30,2 cm). El preacondicionado y la separación se llevaron a cabo según el manual de instrucciones.

50 Preparación de muestras para EM-IEP

El tampón de las muestras purificadas con proteína A se intercambió con MOPS 2 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02% (p/v) utilizando concentradores giratorios (5.000 de MWCO, Millipore). Se congelaron las proteínas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

55 Análisis de EM-IEP de estructuras de glicano de Fc e IgG entera humanas mediante infusión directa (detección fuera de línea)

Desalado mediante cromatografía de exclusión por tamaño:

60 Se inyectaron 20 a 50 µg (hasta 90 µl) de Fc tras el tratamiento del anticuerpo con las proteasas plasmina y carboxipeptidasas B y con las endoglucosidasa Endo S y Endo H, o IgG enteras tras el tratamiento con Endo S, Endo H y carboxipeptidasa B, en una columna Sephadex G25 autoempaquetada ECO SR (5x250 mm, KronLab)

equilibrada con ácido fórmico al 2%, acetonitrilo al 40% a un caudal de 0,5 ml/min. durante 30 minutos. La muestra de proteína inyectada se desaló aplicando una elución isocrática de 8 minutos con ácido fórmico al 2% y acetonitrilo al 40% a un caudal de 1 ml/min. La elución de la proteína desalada se registró con UV a 280 nm y la muestra en elución (volumen de aproximadamente 200 a 300 µl) se recogió en un vial de reacción de 1,5 ml. Con una alícuota de la muestra desalada se rellenó manualmente una aguja de vidrio con recubrimiento metálico (aguja Nano ESI Proxeon Biosystems, nº de cat. ES387), se insertó en la fuente de nanopulverización del instrumento de EM y se pulverizó en un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF II de Waters o en un espectrómetro de masas Q-Star Elite de Applied Biosystems.

10 Parámetros de EM para la infusión directa:

A) de muestras tratadas con plasmina (Fc humana) en un instrumento Q-TOF II (Waters)

15 Se capturaron los espectros de EM utilizando un voltaje capilar de 1.000 V, un voltaje del cono de 30 V en un intervalo de masas de 1.000 a 2.000 m/z en modo de iones positivos utilizando una temperatura de la fuente de 80°C. La temperatura de desolvatación se encontraba desactivada. Se capturaron los datos de EM durante aprox. 2 a 3 minutos por el software del instrumento correspondiente.

20 *B) de anticuerpo entero en un instrumento MaXis-EM-IEP (Bruker)*

25 Se capturaron los espectros de EM utilizando un dispositivo NanoMate como interfaz de pulverización. Los valores de captura de datos en el instrumento de EM se fijaron en 400 Vpp (RF de embudo), 120 eV (energía de la ISCID) y 400 Vpp (RF de Multipol) con referencia a los parámetros de transferencia, 5,0 eV (energía iónica) y 300 m/z (masa baja) para los parámetros de cuadrupolo, 15 eV (energía de colisión) y 3.000 Vpp (RF de colisión) para ajustar la celda de colisión y 800 Vpp, 160 ms de tiempo de transferencia y 20 ms de almacenamiento de prepulso en el enfriador de iones. Los datos se registraron en un intervalo de masas de entre 1.000 y 4.000 m/z en modo de iones positivos.

30 La masas molares de los fragmentos Fc diméricos y del anticuerpo entero, que contenían diferentes combinaciones de estructuras de glicano truncadas por las endoglucosidasas aplicadas, es decir GlcNAc/GlcNAc, GlcNAc + Fuc/GlcNAc y GlcNAc+Fuc/GlcNAc+Fuc, se determinaron a partir del patrón m/z respectivo de la especie fragmento Fc o anticuerpo entero utilizando un software desarrollado en el propio laboratorio. Las proporciones relativas de los diversos fragmentos Fc diméricos o anticuerpos enteros residualmente glucosilados se calcularon con el mismo software del propio laboratorio utilizando la suma de áreas de los picos del espectro de m/z de una variante de glucosilación diferente del fragmento Fc dimérico o anticuerpo entero.

35 *Análisis de EM-IEP de estructuras de glicano de IgG entera mediante CL-EM (detección en línea)*

40 Se llevó a cabo una CL-EM en un sistema de HPLC Dionex (Dionex Ultimate 3000) acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF II (Waters). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ACE C4 (tamaño de partícula: 5 mm; tamaño de poro: 300 Å, 1x30 mm; Advanced Chromatography Technologies). El eluyente A era ácido fórmico al 0,1%; el eluyente B era 99,9% acetonitrilo y 0,1% ácido fórmico. El caudal era de 100 µl/min, la separación se llevó a cabo a 75°C y se utilizaron 2 mg (10 ml) de una muestra de anticuerpo intacto tratada con Endo S y Endo H, aunque sin tratamiento de plasmina.

45

TABLA 1. Parámetros de la CL-EM.

Tiempo (min.)	% de B	observación
0	25	residuo
3	25	
3,1	25	
3,5	25	cambio a EM
4,0	25	
9,0	50	
9,5	100	
12,5	100	
12,6	25	
14,9	25	cambio a residuo
15,0	255	paro de detección de EM

Se capturaron los espectros de EM utilizando un voltaje capilar de 2.700 V, un voltaje del cono de 80 V en un intervalo de masas de 1.000 a 4.000 m/z en modo de iones positivos utilizando una temperatura de la fuente de 100°C. La

temperatura de desolvatación se fijó en 200°C. Los datos de EM se captaron durante aproximadamente 11,4 minutos (tiempo de gradiente de 3,5 a 14,9 min.) con el software del instrumento correspondiente.

5 La masas molares del anticuerpo entero (que consistía de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), que contenía diferentes combinaciones de estructuras de glicano truncadas por las endoglucosidasas aplicadas, es decir GlcNAc/GlcNAc, GlcNAc + Fuc/GlcNAc y GlcNAc+Fuc/GlcNAc+Fuc, se determinaron a partir del patrón m/z respectivo de la especie anticuerpo utilizando un software desarrollado en el propio laboratorio. Las proporciones relativas de los diversos anticuerpos intactos residualmente glucosilados se calcularon con el mismo software del propio laboratorio utilizando la suma de áreas de los picos del espectro de m/z de una variante de glucosilación diferente del anticuerpo entero.

15 La proporción de cadenas pesadas no fucosiladas se determinó mediante reducción del anticuerpo tratado con EndoS y EndoH con TCEP (hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina) y llevando a cabo un análisis de CL-EM tal como se ha indicado anteriormente, utilizando el mismo ajuste de tipo de columna y gradiente, aunque algunos parámetros modificados para la captura de datos de EM. Los parámetros del EM eran los mismos que los indicados anteriormente, pero el voltaje del cono se fijó en 25 V y el intervalo de masas era de entre 600 y 2.000 m/z.

Ejemplo 2: resultados

20 Desglucosilación de Fc

25 La N-glucosidasa F, también conocida como PNGasa F, es una desglucosidasa altamente específica que corta entre la N-acetilglucosamina más interna de oligosacáridos unidos mediante N ricos en manosa, híbridos y complejos y el residuo de asparagina de la glucoproteína a la que se encuentra unida el glicano (Tarentino *et al.*, 1985). El tratamiento de los fragmentos Fc de los anticuerpos A y C con PNGasa F siguiendo las instrucciones del fabricante se siguió mediante EC-SDS. Bajo estas condiciones, la PNGasa F elimina cuantitativamente la fracción glicano de ambas muestras analizadas, resultando en un desplazamiento de movilidad del pico principal de $3,79 \times 10^{-5}$ a $3,9 \times 10^{-5}$ (figura 2).

30 La Endo S corta el núcleo de quitobiosa de los oligosacáridos unidos mediante N, dejando el primer residuo de N-acetilglucosamina (y un residuo de α -fucosa en el caso de los carbohidratos fucosilados), unido a la proteína. El análisis de EC de dicha muestra glucomanipulada digerida reveló que aproximadamente 10% de la proteína todavía se encontraba sin digerir (figura 2a, Tabla 2), tal como demuestra un pico con una movilidad de $3,84 \times 10^{-5}$. El análisis posterior mediante tratamiento con PNGasa F indicó que los carbohidratos resistentes a Endo S presentaban enteramente una estructura híbrida, sugiriendo una especificidad de dicho enzima para los carbohidratos complejos. Este resultado pudo corroborarse mediante la digestión cuantitativa con Endo S del anticuerpo A de tipo salvaje, que resultó en proteína homogéneamente desglucosilada (figura 2b).

TABLA 2. Área de pico de los fragmentos Fc tratados enzimáticamente, evaluada mediante EC-SDS.

Anticuerpo, enzima	Área de pico [%]	
	No cortado	Cortado
A, nada de enzima	99,3	0,7
A, PNGasa F	1,3	98,7
A, Endo S	1,8	98,2
C, nada de enzima	100,0	0,0
C, PNGasa F	0,3	99,7
C, Endo S	10,6	89,4

40 Para confirmar dicha hipótesis, se purificó Fc tratado con Endo S del anticuerpo C mediante cromatografía de afinidad para eliminar el enzima y los carbohidratos cortados, y posteriormente se incubó con PNGasa F para eliminar la fracción glicano entera. Los carbohidratos hidrolizados se analizaron adicionalmente mediante EM MALDI-TOF. Los espectros obtenidos demostraron que Endo S discriminaba (es decir, no afectaba) las estructuras bisectadas complejas o híbridas correspondientes a m/z=1.663 (figura 3b).

50 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar si los carbohidratos discriminados eran estructuras bisectadas complejas o híbridas. Tras la purificación mediante cromatografía de afinidad, el fragmento Fc tratado con Endo S del anticuerpo C se incubó con PNGasa F o endoglucosidasa H (Endo H). Endo H es una glucosidasa recombinante que corta dentro del núcleo de quitobiosa de los oligosacáridos unidos mediante N ricos en manosa e híbridos de las glucoproteínas. No es capaz de cortar dentro de estructuras complejas. Los espectros de EM MALDI-TOF demostraron que los carbohidratos discriminados por Endo S son cortados por Endo H, resultando en un pico principal en m/z=1.460 (figura 3c). Estos datos demuestran claramente que Endo S no es capaz de liberar los carbohidratos bisectados híbridos de la N-acetilglucosamina unida a asparagina.

55

Con el fin de obtener material homogéneamente desglucosilado que solo variase en su contenido de fucosa α -ligada, se llevó a cabo un tratamiento combinado del fragmento Fc del anticuerpo C con Endo S y Endo H, resultando en una proteína que era desglucosilada cuantitativamente tras el primer residuo de GlcNAc, tal como se observó en EC-SDS (figura 4a). El análisis de EM MALDI-TOF demostró que las estructuras bisectadas híbridas ($m/z=1.460$) eran liberadas por la combinación de estos dos enzimas (figura 4b). Para confirmar que la ausencia de ningún otro carbohidrato unido a la N-acetilglucosamina con o sin un residuo de fucosa α -ligada, se incubó fragmento Fc del anticuerpo C tratado con Endo S y Endo H, con PNGasa F. No pudieron obtenerse espectros de MALDI-TOF después de este tratamiento, sugiriendo que no quedaba ningún otro carbohidrato que no pudiese ser cortado por Endo S o Endo H (datos no mostrados).

Determinación de la distribución de la fucosa en una preparación de Fc

Para cuantificar la distribución de la fucosa unida al residuo N-acetilglucosamina unido a Fc, se llevaron a cabo análisis de EM-IEP. Tras la incubación con Endo S y Endo H antes de la separación mediante cromatografía de afinidad, los dominios Fc de los anticuerpos A, B y C (generados mediante digestión con plasmina) se trataron con carboxipeptidasa B para eliminar la heterogeneidad introducida por la lisina C-terminal.

Los espectros de EM-IEP revelaron fragmentos Fc con dos, una o ninguna fucosa unida al GlcNAc residual todavía unido a la proteína tras el tratamiento de EndoS/EndoH (figura 5). Se resume la distribución de estas tres especies de fucosa para las tres IgG A, B y C diferentes investigadas (calculada como proporción relativa de la suma de áreas de picos en los espectros de m/z). Los resultados se correlacionan bien con el contenido de fucosa determinado mediante EM MALDI-TOF (Tabla 3).

TABLA 3. Comparación del grado de a-fucosilación determinado mediante espectrometría de masas para el fragmento Fc de los anticuerpos A, B y C.

	MALDI-TOF No fuc. [%]	EM-IEP			Sin fuc. [%]
		2 fucosas [%]	1 fucosa [%]	0 fucosas [%]	
A	2,12	94	3	3	4,5
B	47,0	29	41	30	50,5
C	69,6	20	40	40	60,0

Desglucosilación de IgG entera

Para la desglucosilación de una IgG entera mediante tratamiento combinado con Endo S y Endo H, resultó necesario optimizar las condiciones del corte. La desglucosilación con una proporción molar de Endo S a IgG de 1:20, tal como se utilizó para la desglucosilación del fragmento Fc, resultó insuficiente para desglucosilar una IgG entera. El incremento de la concentración de Endo S hasta una proporción molar de 1:7 resultó suficiente para obtener material homogéneamente desglucosilado que sólo variable en su contenido de fucosa α -ligada observado mediante EC-SDS (figura 6a). El análisis de MALDI-TOF demostró que los carbohidratos resultan liberados por el tratamiento combinado con Endo S y Endo H (figura 6b). Mediante la utilización de este enfoque resulta posible analizar la asignación de fucosa por cada IgG sin necesidad de generar separadamente el fragmento Fc.

Determinación de la distribución de fucosa de IgG entera

Se llevó a cabo la cuantificación de la distribución de la fucosa unida al residuo de N-acetilglucosamina más interno de glicanos unidos mediante N de IgG enteras utilizando el anticuerpo de tipo salvaje A (2,12% de a-fucosilación) y anticuerpo D glucomanipulado (85,0% de a-fucosilación). Tras el tratamiento combinado con Endo S y Endo H, se incubaron ambas IgG con carboxipeptidasa B para eliminar la heterogeneidad introducida por la lisina C-terminal. Los anticuerpos se purificaron seguidamente mediante cromatografía de afinidad.

Se determinó la asignación de la fucosa nuclear por cada IgG utilizando dos métodos diferentes. El patrón de los espectros de m/z obtenidos mediante la detección fuera de línea de EM-IEP reveló especies de IgG con dos, una o ninguna fucosa unida al GlcNAc residual tras el tratamiento con EndoS/EndoH (figura 8). Se resume la distribución de estas tres especies de fucosa para dos IgG diferentes, A y D, investigadas (calculada como proporción relativa de la suma de áreas de picos en los espectros de m/z) (Tabla 4).

También se llevaron a cabo análisis de CL-EM para determinar la asignación de fucosa por cada IgG (figura 9). Para ambas IgG, los espectros de m/z mostraron una proporción similar de especies con dos, una o ninguna fucosa unida, tal como se observa en la detección fuera de línea mediante EM-IEP (Tabla 4). Las áreas de pico inferiores a 5% se encuentran dentro de la sensibilidad de detección de los métodos para IgG enteras. La proporción para cadena pesada no fucosilada se presenta en la Tabla 4, columna *Sin fuc. [%]*.

TABLA 4. Comparación del grado de a-fucosilación y asignación de fucosas determinados mediante análisis de EM-IEP y CL-EM para los anticuerpos A y D.

	EM-IEP				CL-EM			
	2 fucosas [%]	1 fucosa [%]	0 fucosas [%]	Sin fuc. [%]	2 fucosas [%]	1 fucosa [%]	0 fucosas [%]	Sin fuc. [%]
A	92	5	<5	8	94	6	<5	12
D	9	24	67	81	10	24	66	80

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpo glucosilado o de un fragmento del mismo, que comprende:
- 5 a) eliminación enzimática de residuos sacáridos heterogéneos de la proteína, b) eliminación enzimática de otros residuos heterogéneos de la proteína, c) posterior análisis de la proteína, en el que la eliminación en la etapa a) se lleva a cabo con Endo S y Endo H.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa c) comprende además una etapa de purificación previa al análisis.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se determina la cantidad de residuos de fucosa y su patrón de distribución entre moléculas dentro de una preparación de anticuerpos.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se determina la distribución de residuos de fucosa por cada molécula de Fc en una preparación de anticuerpos.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la eliminación en la etapa b) se lleva a cabo con plasmina y/o carboxipeptidasa B.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el análisis de la etapa c) comprende análisis de CL-EM, análisis de EC-peso de SDS o análisis de EM-IEP.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
- a) proporcionar una preparación de anticuerpos,
- b) opcionalmente aislar la parte de fragmento Fc de dicha preparación de anticuerpos,
- c) eliminar todos los residuos sacáridos heterogéneos del anticuerpo o fragmento Fc con Endo H y Endo S,
- 30 d) eliminar los residuos de lisina C-terminal del anticuerpo o fragmento Fc con carboxipeptidasa B,
- e) análisis del anticuerpo o fragmento Fc mediante análisis de CL-EM, de EM-IEP o de EC-PM de SDS.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa e) comprende además una etapa de purificación previa al análisis.
- 35 9. Utilización del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la determinación de la fucosilación cooperativa en una preparación de anticuerpos durante la fermentación.
10. Kit para la utilización en la detección cualitativa y cuantitativa de residuos de fucosa dentro de un péptido, que comprende Endo S, Endo H, plasmina, carboxipeptidasa B, instrucciones que proporcionan un procedimiento según cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 8 y un recipiente para el contenido del kit.
- 40 11. Utilización de Endo S para el corte de oligosacáridos complejos a partir de una glucoproteína en un método para detectar la presencia o la ausencia de residuos de fucosa dentro de un anticuerpo glucosilado o de un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45

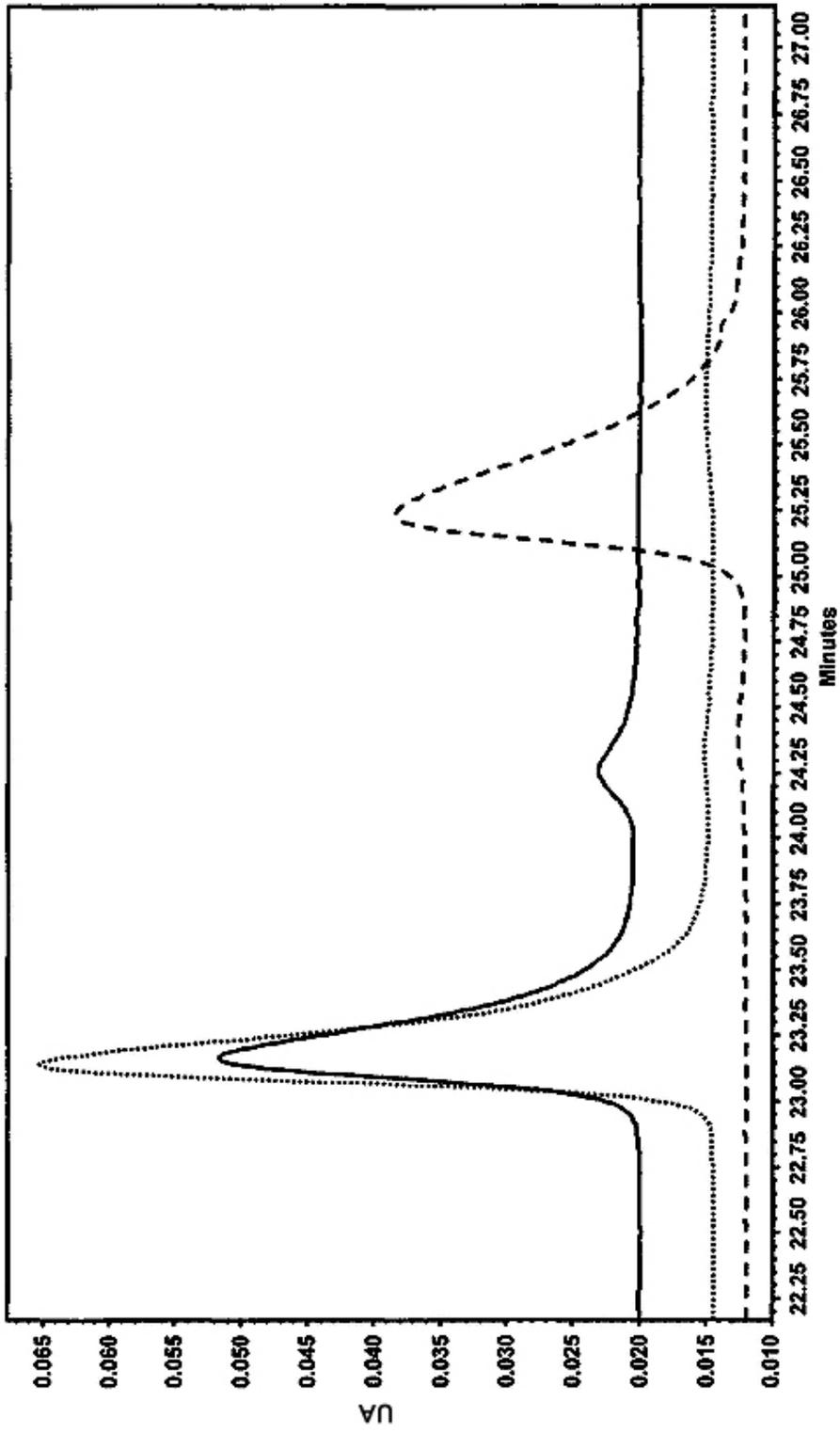


Figura 2a

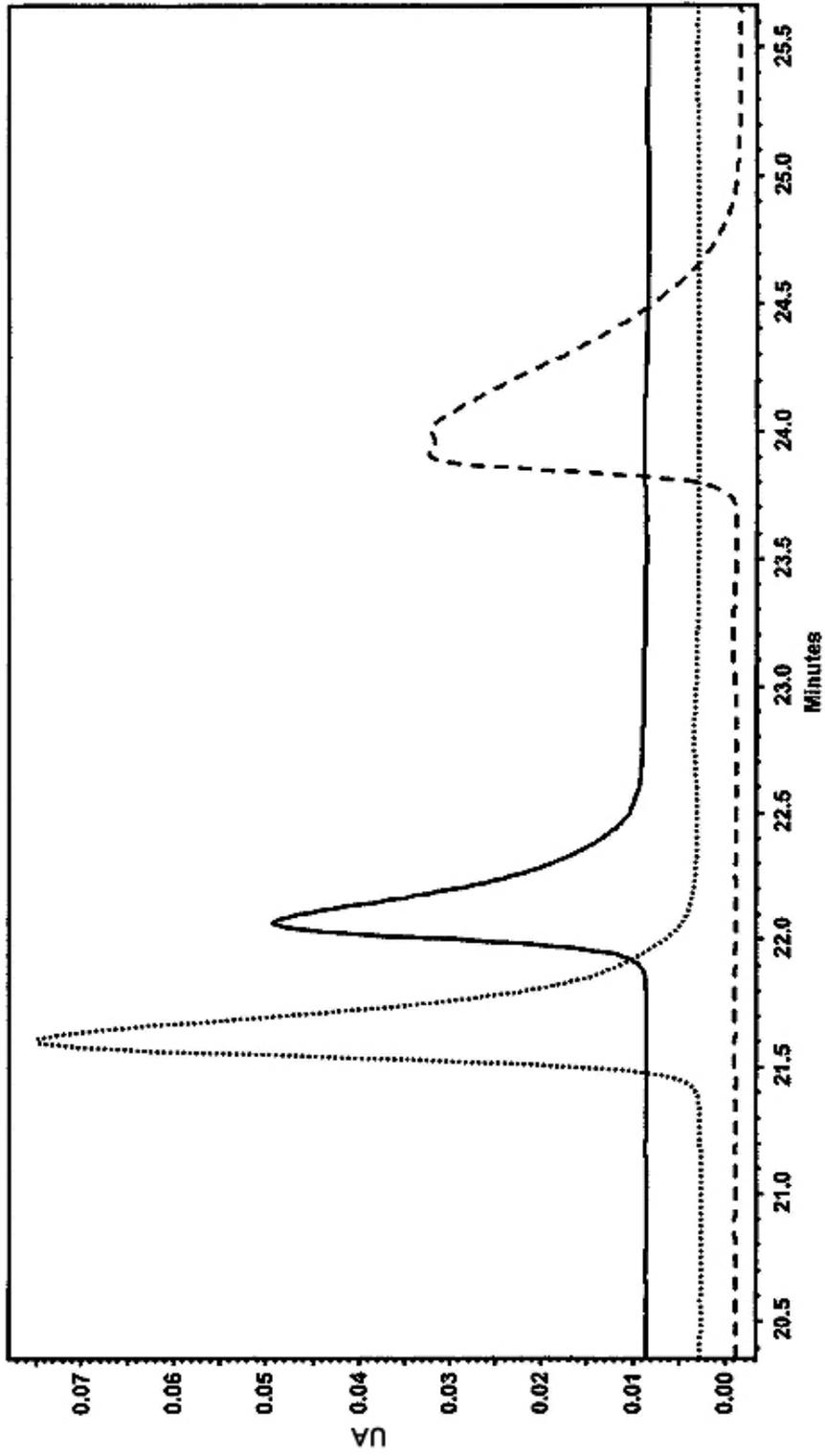


Figura 2b

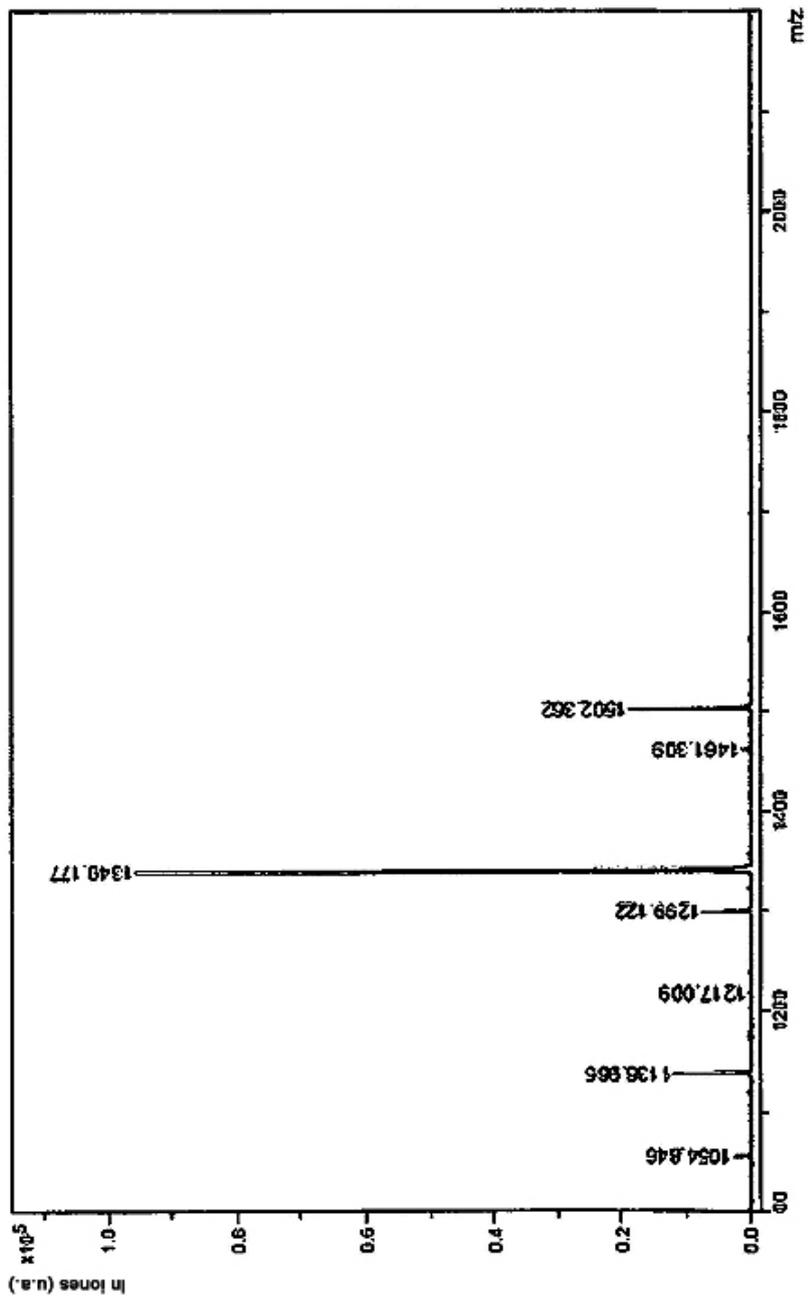


Figure 3a

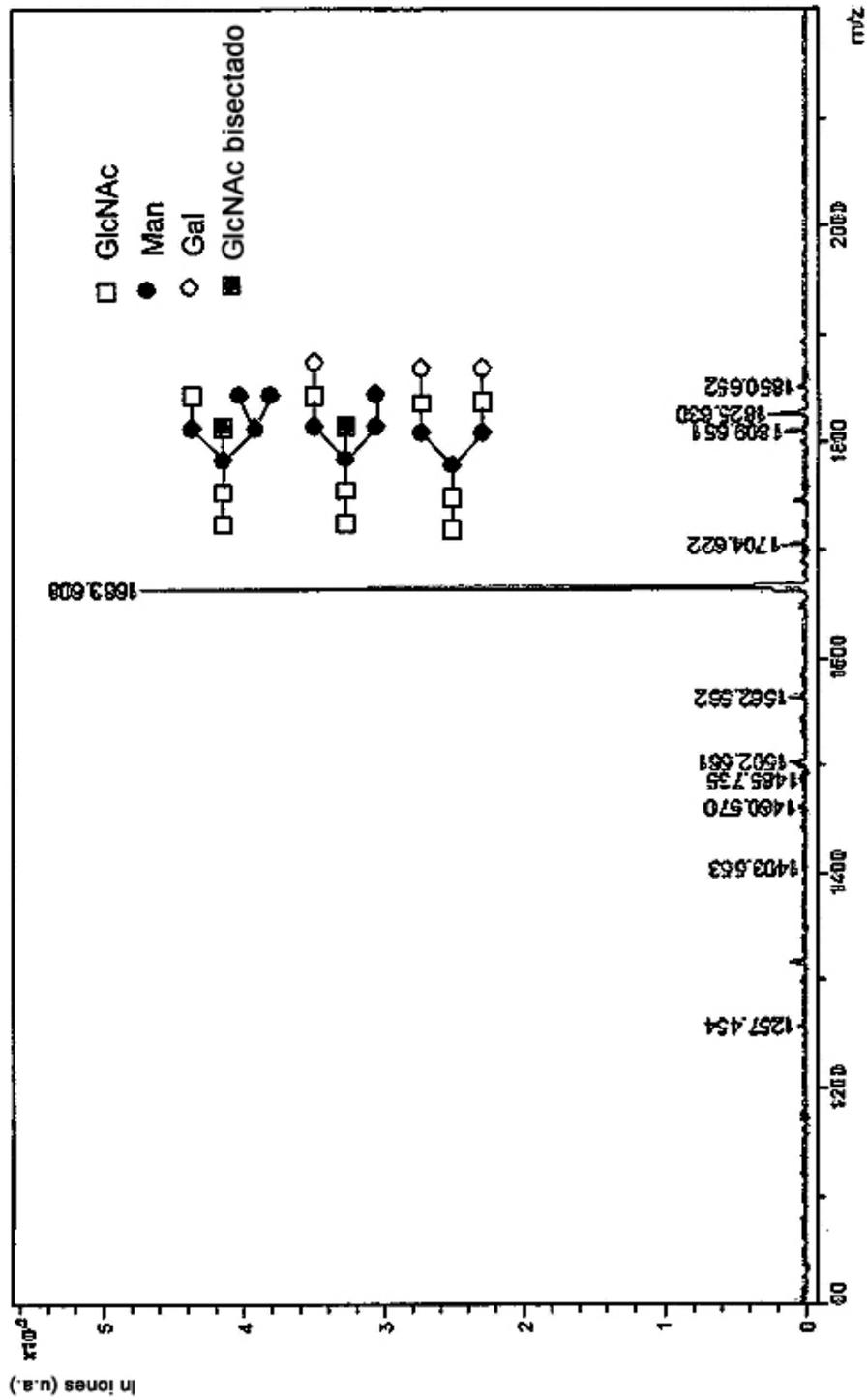


Figura 3b

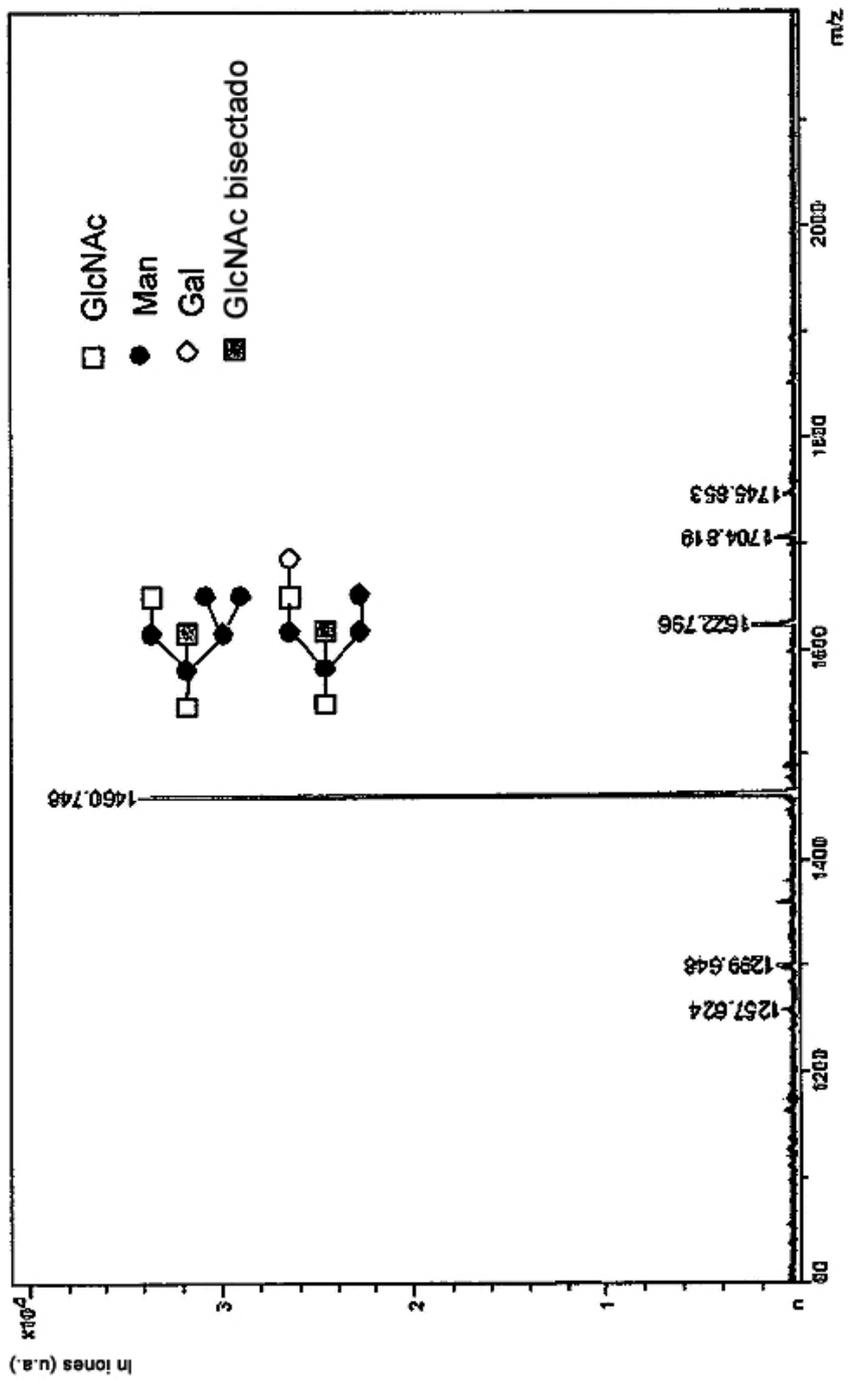


Figura 3c

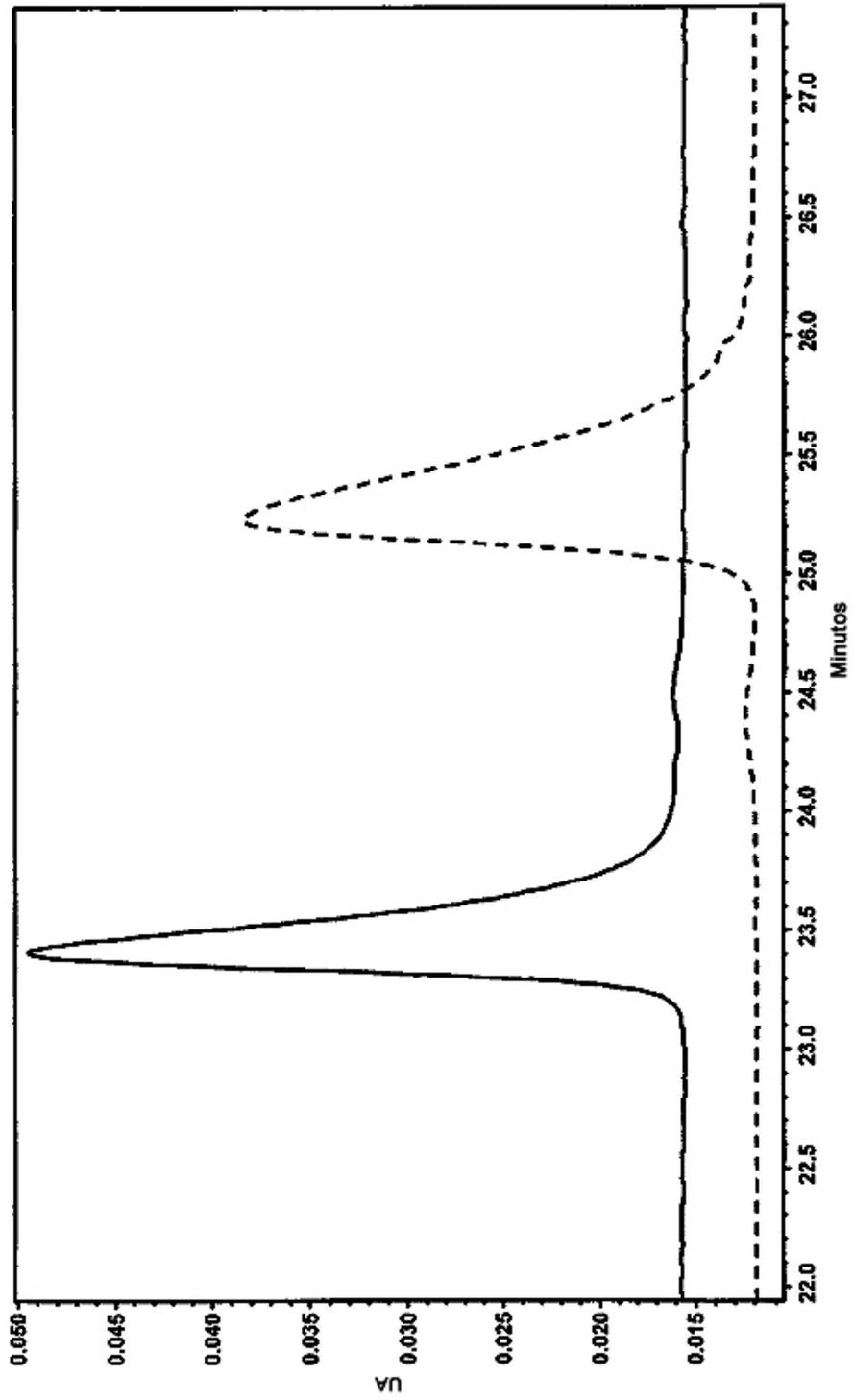


Figura 4a

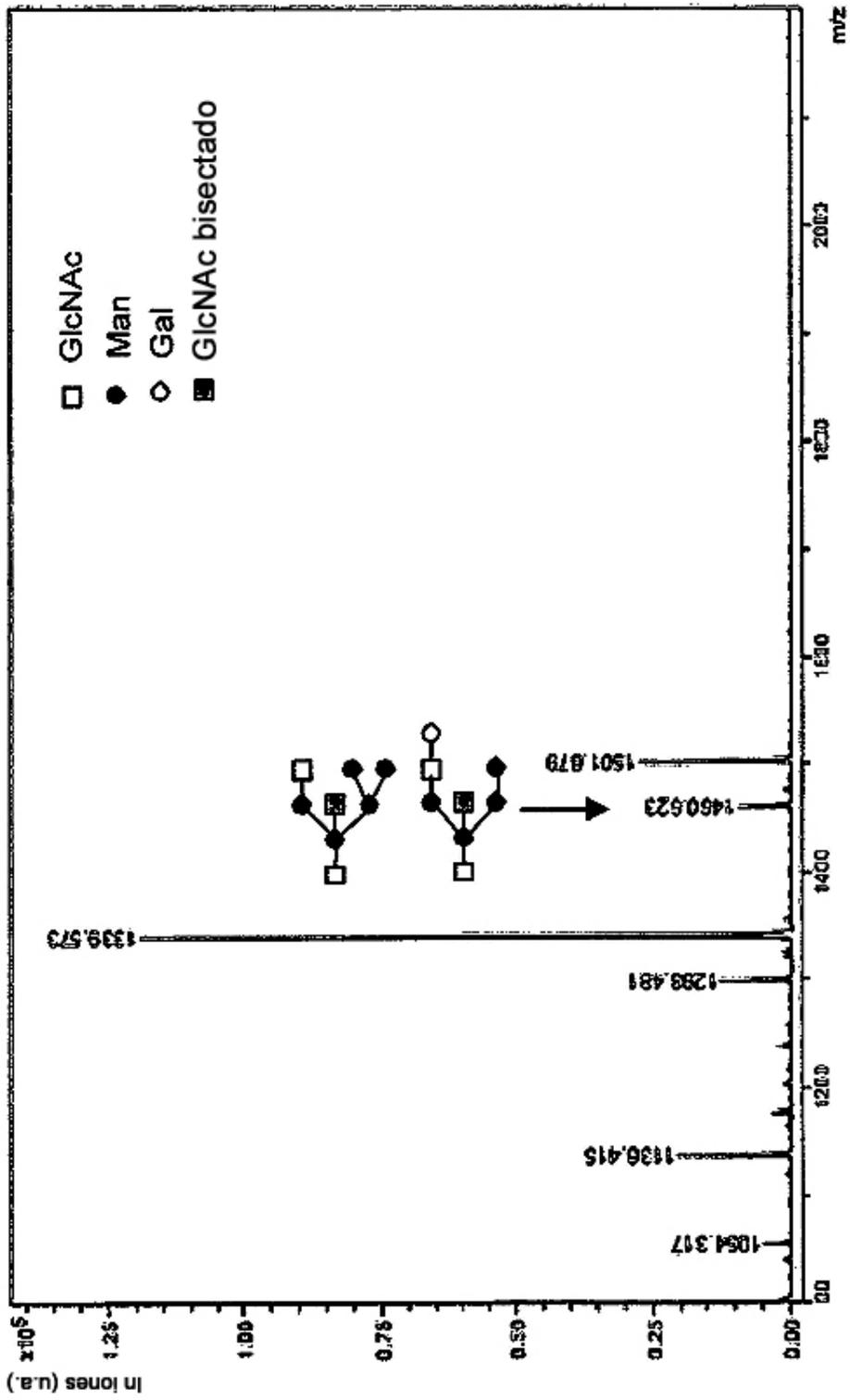
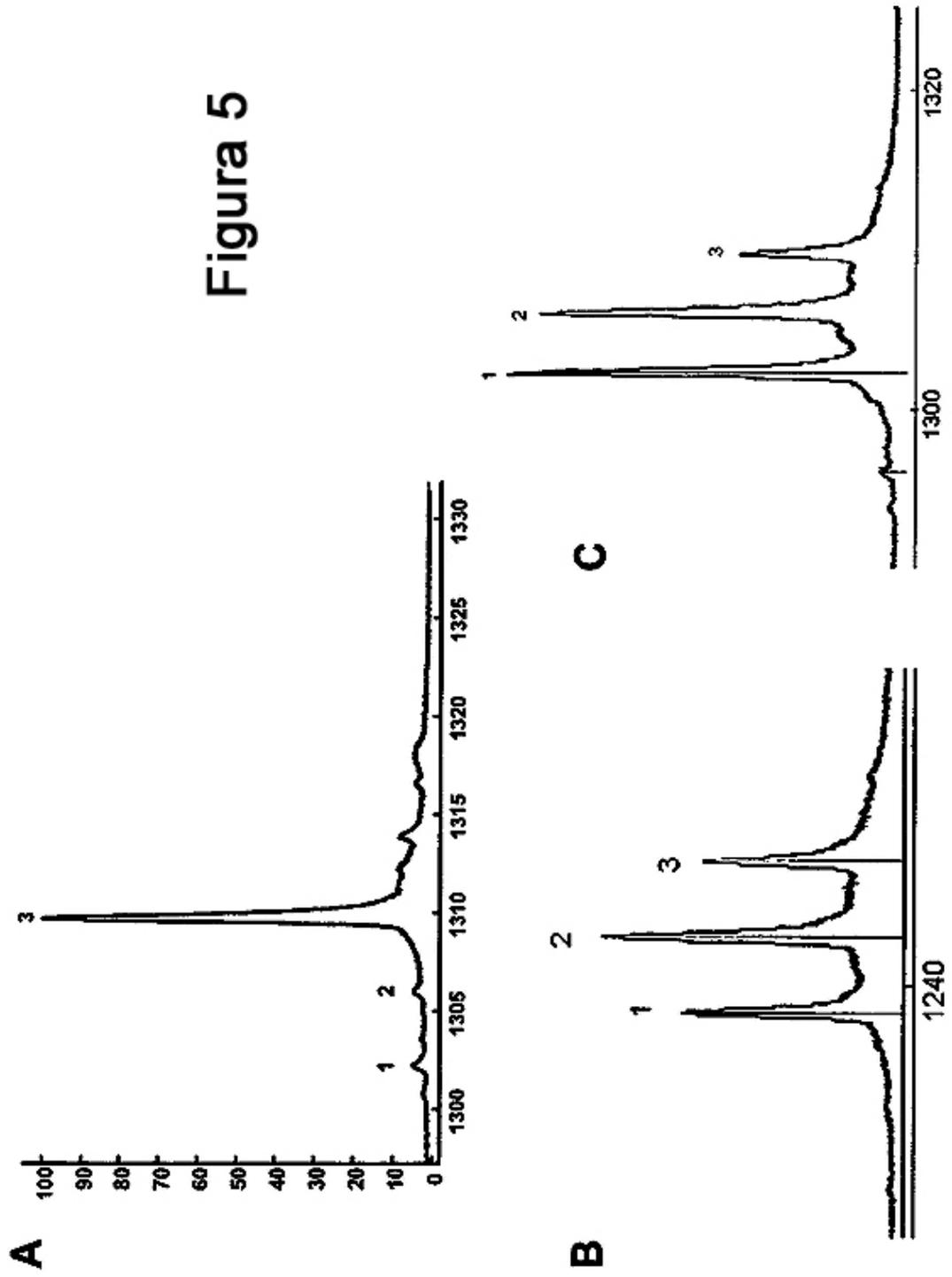


Figura 4b



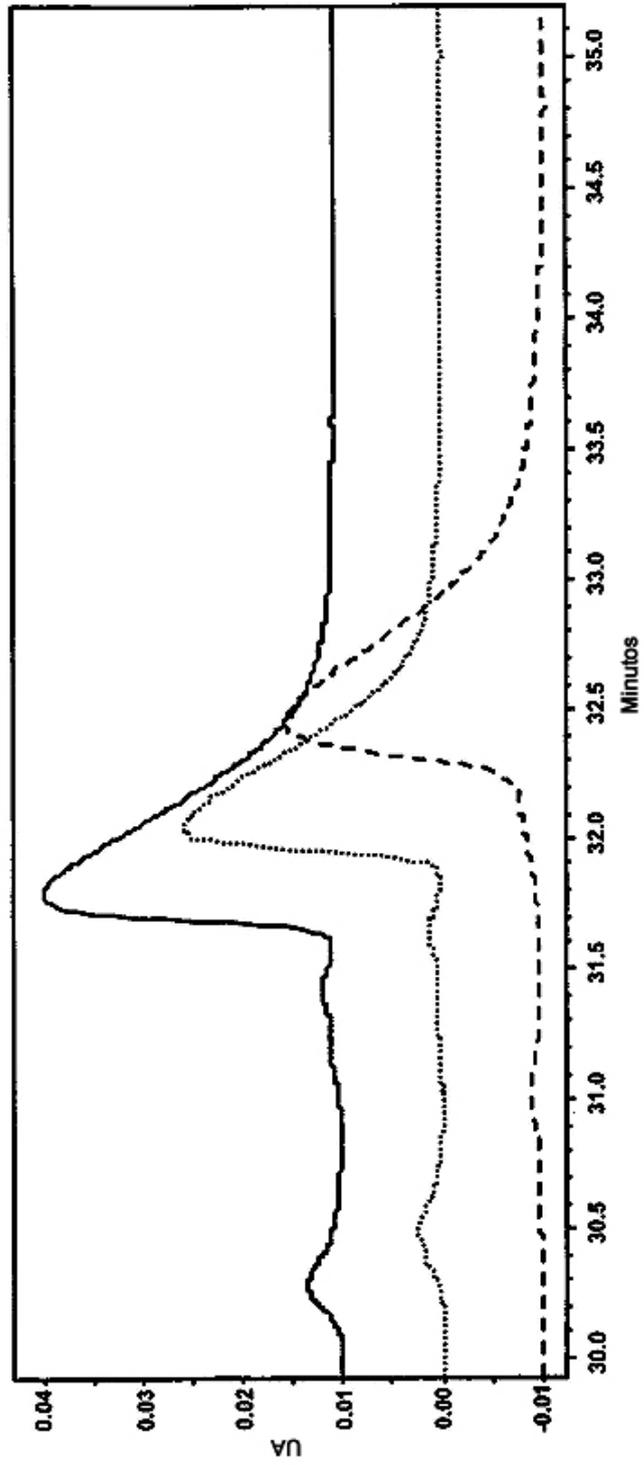


Figura 6a

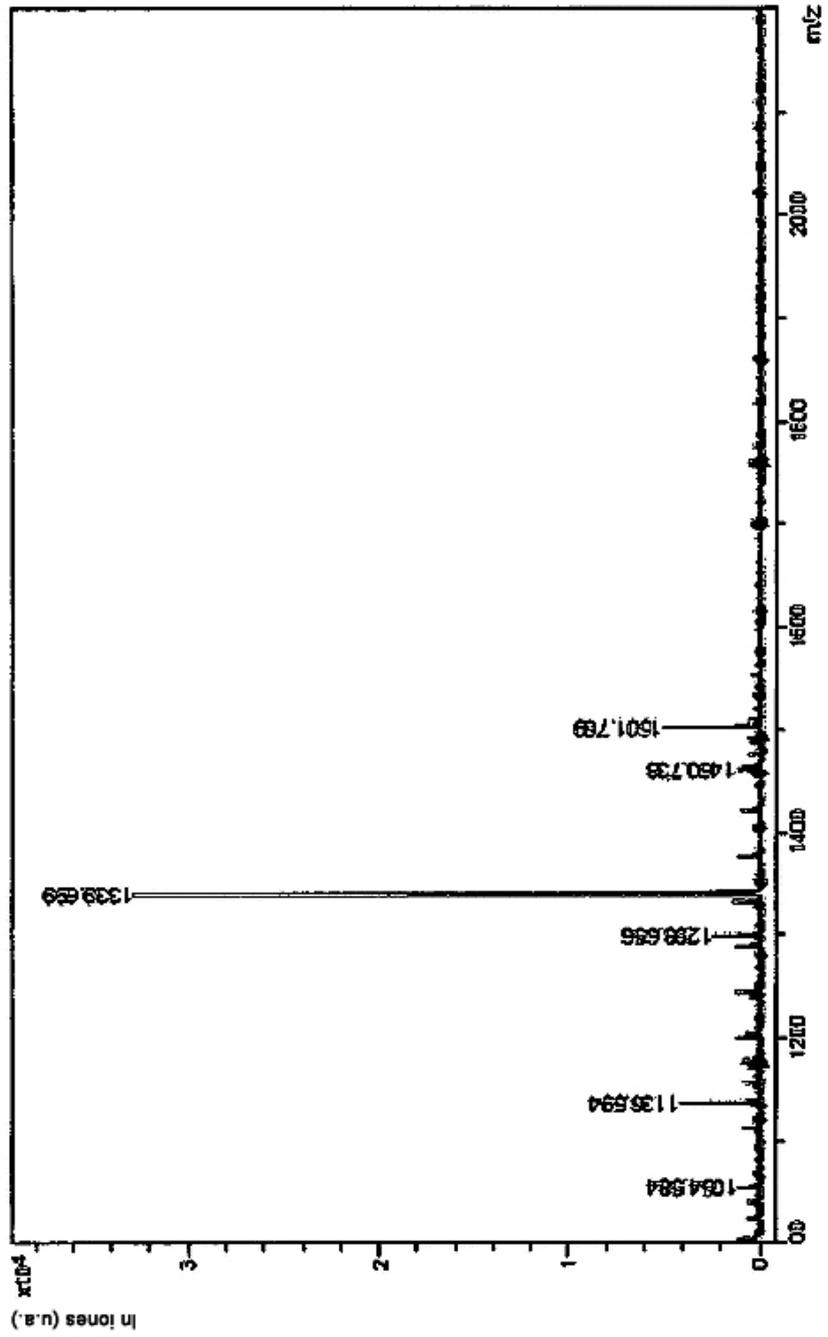


Figura 6b

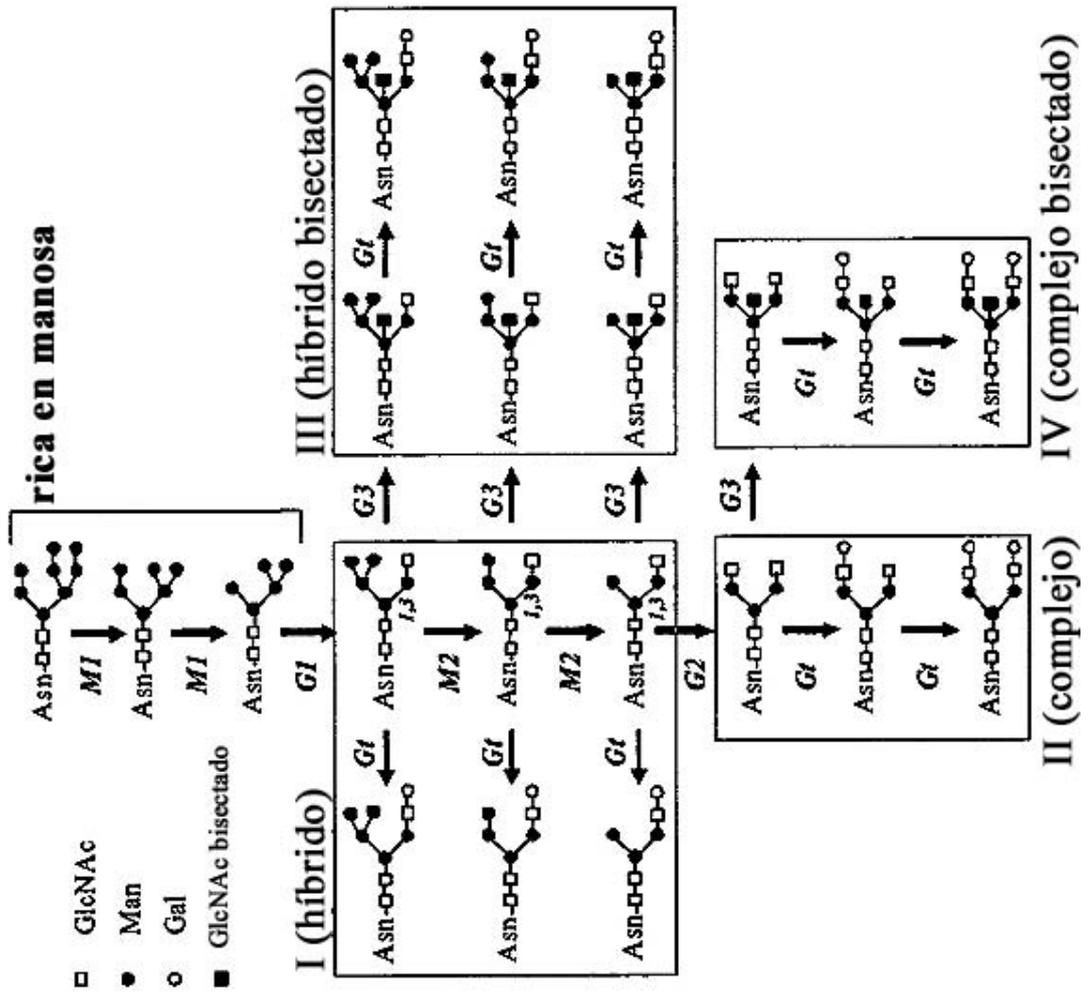


Figura 7

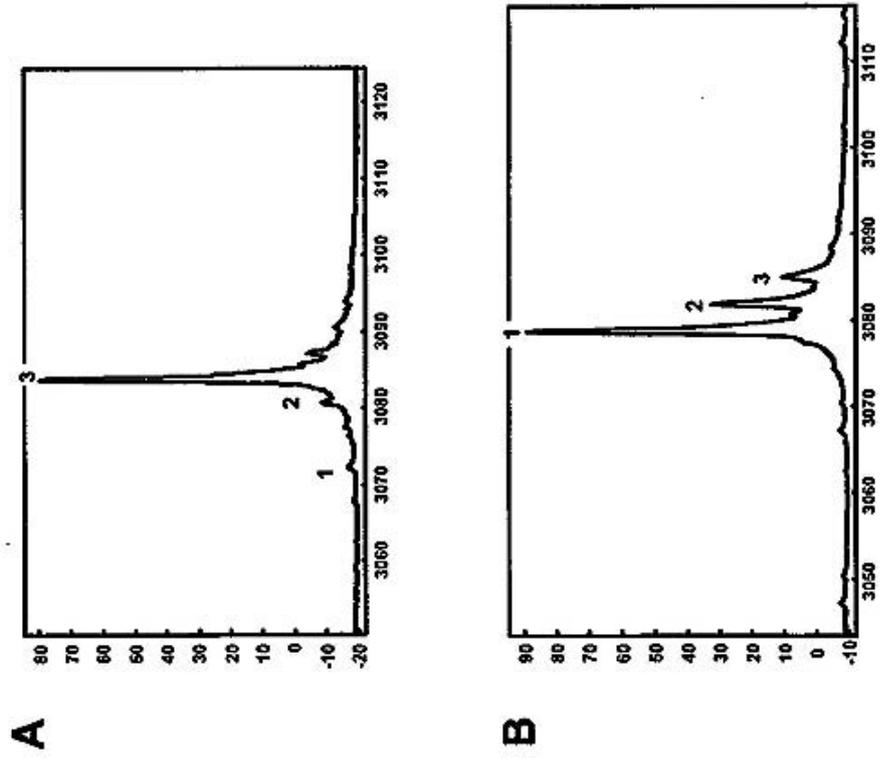


Figura 8

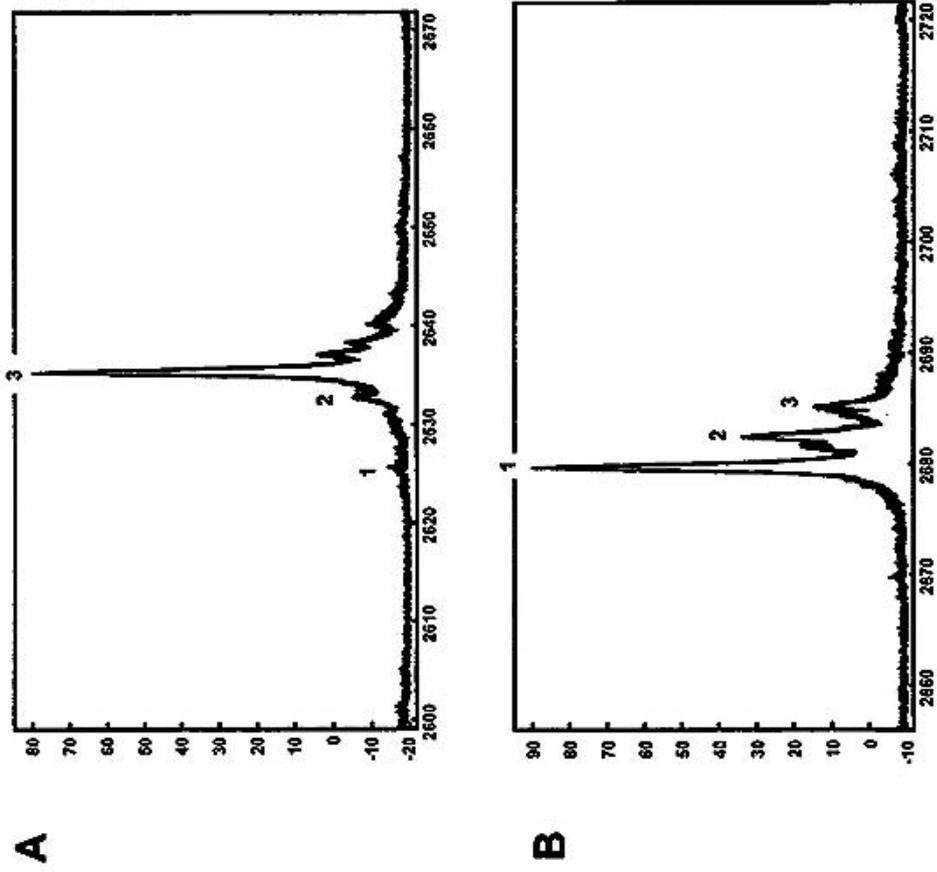


Figura 9