

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 963**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10703235 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2394173**

54 Título: **Análisis del patrón de glicosilación de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

09.02.2009 EP 09001757

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

19.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOLL, HANS;
REGULA, JOERG, THOMAS;
SONDERMANN, PETER y
ZECK, ANNE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 535 963 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

Análisis del patrón de glicosilación de inmunoglobulina

- 5 La presente invención se refiere a un método para determinar el patrón de glicosilación de un fragmento Fc de inmunoglobulina. También se presenta un método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina glicosilada, así como un método para producir un fragmento Fab₂ de inmunoglobulina.

Antecedentes de la presente invención

- 10 En los últimos años la industria farmacéutica ha tenido mucho éxito con productos basados, entre otros, en enzimas, anticuerpos y citosinas, tales como eritropoyetina, interferones, activador de plasminógeno, etc. y la demanda mundial de agentes terapéuticos proteicos aumenta cada año. Los anticuerpos monoclonales (AMC) son un grupo importante de agentes terapéuticos proteicos. Se llaman monoclonales porque, a diferencia de los anticuerpos policlonales, son secretados por células inmunitarias (clones celulares) derivadas de una sola célula formadora de anticuerpos. Una característica de los anticuerpos monoclonales es que cada uno de ellos va dirigido solamente contra un epítipo de una sustancia inmunógena y por tanto se puede usar muy específicamente en el tratamiento de enfermedades. Como ejemplos de agentes terapéuticos proteicos cabe mencionar los anticuerpos monoclonales trastuzumab (marca comercial: Herceptin), daclizumab (marca comercial: Zenapax) y rituximab (marca comercial: MabThera), producidos por Roche, que entre otras cosas se han utilizado con éxito para el tratamiento del cáncer de mama (trastuzumab), el rechazo de órganos (daclizumab) y el linfoma no Hodgkin.

- 20 Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se obtienen mediante procesos biotecnológicos complejos. Durante su producción, formulación y almacenamiento se pueden formar productos de degradación, debido frecuentemente a procesos tales como oxidación y desamidación, y también a divisiones proteolíticas (Yan, B. y otros, J. Chromatogr. A 1164 (2007) 153-161). Además de su acción también es importante la calidad de un producto biofarmacéutico, es decir su pureza, integridad, estado de agregación y patrón de glicosilación.

- 30 La cisteína endoproteasa IdeS (enzima que degrada la inmunoglobulina) del patógeno humano *Streptococcus pyogenes*, también conocida como Mac-1 o sib-38, es una cisteína proteasa que divide específicamente la cadena pesada de los anticuerpos del tipo de la inmunoglobulina G (IgG). La IgG es hasta ahora el único sustrato conocido del enzima IdeS (Vincent, B. y otros, Biochem. 43 (2004) 15540-15549). El IdeS consta de 339 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 29 aminoácidos (von Pawel-Rammingen, U. y otros, EMBO J. 21 (2002) 1607-1615). El IdeS corta las subclases IgG1, IgG3 e IgG4 de IgG humana entre los aminoácidos 236 y 237 (Gly-Gly) contenidos en la secuencia de reconocimiento (LL)GGP. 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, así como la IgG de conejo (LLGGPS), también se dividen (véase Vincent, B. y otros, Biochem. 43 (2004) 15540-15549; Wenig, K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 17371-17376).

- 40 Hess, J.K., y otros (Hess, J.K., y otros, J. Microbiol. Meth. 70 (2007) 284-291) revelan un método de espectrometría de masas para determinar 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 aislado del *S. pyogenes* que tiene actividad de cisteína proteasa IgG. En la patente europea EP 1 458 861 A se describe un método para la formación de fragmentos de anticuerpo Fc o Fab. En la patente WO 2006/131347 se describe la proteasa IdeS de los estreptococos del grupo A.

- 45 El perfil de glicosilación - p.ej. de un polipéptido - es una característica importante para muchos polipéptidos terapéuticos producidos de forma recombinante. Los polipéptidos glicosilados, también denominados glicoproteínas, intervienen en muchas funciones esenciales de organismos eucariotas, p.ej. humanos, y de algunos procariotas, incluyendo catálisis, señalización, comunicación célula-célula, actividades del sistema inmunitario, así como reconocimiento y asociación molecular. Constituyen la mayoría de proteínas no citosólicas en los organismos eucariotas (Lis, H. y otros, Eur. J. Biochem. 218 (1993) 1-27). La formación/fijación de oligosacáridos a una proteína es una modificación co- y post-translacional, y por lo tanto no está controlada genéticamente. La biosíntesis de oligosacáridos es un proceso de varias etapas en el cual están involucrados varios enzimas que compiten entre sí por el sustrato. Por consiguiente los polipéptidos glicosilados comprenden una variedad microheterogénea de oligosacáridos que dan lugar a un conjunto de glicofomas distintas que contienen la misma estructura principal de aminoácidos.

- 50 Los oligosacáridos unidos mediante enlace covalente influyen en la estabilidad física, el plegamiento, la resistencia al ataque de las proteasas, las interacciones con el sistema inmunitario, la bioactividad y la farmacocinética del respectivo polipéptido. Además algunas glicofomas pueden ser antígenas, lo cual da pie a que los organismos de regulación exijan análisis de las estructuras de los oligosacáridos de los polipéptidos glicosilados recombinantes (véase p.ej. Paulson, J.C., Trends Biochem. Sci. 14 (1989) 272-276; Jenkins, N. y otros, Nature Biotechnol. 14 (1998) 975-981). Se ha señalado, por ejemplo, que la sialilación terminal de los polipéptidos glicosilados incrementa la vida media del suero y que los polipéptidos glicosilados provistos de estructuras de oligosacárido con restos de galactosa terminales son eliminados en mayor medida de la circulación (Smith, P.L. y otros, J. Biol. Chem. 268 (1993) 795-802).

Las inmunoglobulinas se diferencian de otros polipéptidos recombinantes por su patrón de glicosilación. Por ejemplo la inmunoglobulina G (IgG) es un polipéptido glicosilado multifuncional y simétrico que tiene una masa molecular aproximada de 150 kDa y consta de dos fragmentos Fab idénticos, responsables de la fijación de antígenos, y del fragmento Fc para las funciones efectoras. En las moléculas de IgG la glicosilación tiende a estar muy conservada en el sitio Asn-297, que está oculto entre los dominios C_H2 de la cadena pesada de Fc formando extensos contactos con los restos de aminoácidos en el interior de C_H2 (Sutton y Phillips, *Biochem. Soc. Trans.* 11 (1983) 130-132). Las estructuras de oligosacárido unidas al Asn-297 se procesan heterogéneamente y por lo tanto una IgG existe en múltiples glicofomas. Hay variaciones en la ocupación del sitio del resto Asn-297 (macroheterogeneidad) o en la estructura del oligosacárido en el sitio de glicosilación (microheterogeneidad), véase por ejemplo Jenkins, N. y otros, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Para analizar los segmentos de carbohidrato de los polipéptidos glicosilados se ha empleado la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC) y la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador del tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) (véase p.ej. Fukuda, M., (ed.) *Glycobiology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; Morelle, W. y Michalsky, J.C., *Curr. Pharmaceut. Design* 11 (2005) 2615-2645). Hoffstetter-Kuhn y otros (*Electrophoresis* 17 (1996) 418-422) utilizaron el análisis por electroforesis capilar y MALDI-TOF MS para describir la heterogeneidad de un anticuerpo monoclonal debida a los oligosacáridos, tras la desglicosilación del anticuerpo con N-glicosidasa F (PNGasa F).

Dada la importancia de la glicosilación en las propiedades funcionales de los polipéptidos glicosilados recombinantes y la necesidad de un proceso de elaboración de los productos bien definido y consistente, es muy conveniente disponer en línea o junto a ella de un análisis del patrón de glicosilación de los polipéptidos glicosilados producidos de forma recombinante durante el proceso de fermentación. Papac y otros (*Glycobiol.* 8 (1998) 445-454) revelaron un método que incluye la inmovilización de polipéptidos glicosilados sobre una membrana de difluoruro de polivinilideno, la digestión enzimática y el análisis por MALDI-TOF MS del perfil de glicosilación. El análisis y la caracterización molecular de los AMC producidos de forma recombinante, incluyendo varias etapas cromatográficas, está descrito en Bailey, M. y otros, *J. Chromat.* 826 (2005) 177-187.

Las inmunoglobulinas producidas por células de mamíferos contienen 2-3% en masa de carbohidratos (Taniguchi, T. y otros, *Biochem.* 24 (1985) 5551-5557). En una inmunoglobulina de clase G (IgG) esto equivale p.ej. a 2,3 restos de azúcar en una IgG de origen murino (Mizuochi, T. y otros, *Arch. Biochem. Biophys.* 257 (1987) 387-394) y a 2,8 restos de azúcar en una IgG de origen humano (Parekh, R.B. y otros, *Nature* 316 (1985) 452-457), de los cuales dos están localizados generalmente en el Asn-297 de la región Fc y los restantes en la región variable (Saba, J.A. y otros, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 16-31).

Para una inmunoglobulina de clase G (IgG), por ejemplo, se conocen diferentes sitios de glicosilación en los cuales los oligosacáridos están o pueden estar unidos a la cadena principal de aminoácidos. En la región Fc de una IgG los restos de oligosacárido se pueden introducir por N-glicosilación en el resto de aminoácido 297, que es asparagina (señalado como Asn-297). Youings y otros han demostrado que hay más sitios de N-glicosilación en el 15-20% de las moléculas de IgG policlonal (Youings y otros, *Biochem. J.*, 314 (1996) 621-630; véase también Endo, T. y otros, *Mol. Immunol.* 32 (1995) 931-940).

Debido al procesamiento inhomogéneo, o sea asimétrico, de oligosacáridos existen isoformas de inmunoglobulinas con glicoesctructura múltiple (Patel, T.P. y otros, *Biochem. J.* 285 (1992) 839-845; Yu-Ip, C.C. y otros, *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 387-399; Lund, J. y otros, *Immunol.* 30 (1993) 741-748). Al mismo tiempo la estructura y la distribución de los oligosacáridos es muy reproducible (es decir, no aleatoria) y específica del sitio (Dwek, R.A. y otros, *J. Anat.* 187 (1995) 279-292).

Algunas de las características de una inmunoglobulina están relacionadas directamente con la glicosilación de la región Fc (véase p.ej. Dwek, R.A. y otros, *J. Anat.* 187 (1995) 279-292; Lund, J. y otros, *J. Immunol.* 157 (1996) 4963-4969 y *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Wright, A. y Morrison, S.L. *J. Immunol.* 160 (1998) 3393-3402), por ejemplo la estabilidad térmica y la solubilidad (West, C.M., *Mol. Cell. Biochem.* 72 (1986) 3-20), la antigenicidad (Turco, S.J., *Arch. Biochem. Biophys.* 205 (1980) 330-339), la inmunogenicidad (Bradshaw, J.P. y otros, *Biochim. Biophys. Acta* 847 (1985) 344-351; Feizi, T. y Childs, R.A., *Biochem. J.* 245 (1987) 1-11; Schauer, R., *Adv. Exp. Med. Biol.* 228 (1988) 47-72), la tasa de eliminación / vida media circulatoria (Ashwell, G. y Harford, J. *Ann., Rev. Biochem.* 51 (1982) 531-554; McFarlane, I.G., *Clin. Sci.* 64 (1983) 127-135; Baenziger, J.U., *Am. J. Path.* 121 (1985) 382-391; Chan, V.T. y Wolf, G., *Biochem. J.* 247 (1987) 53-62; Wright, A. y otros, *Glycobiology* 10 (2000) 1347-1355; Rifai, A. y otros, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 2171-2182; Zukier, L.S. y otros, *Cancer Res.* 58 (1998) 3905-3908) y la actividad biológica específica (Jefferis, R. y Lund, J. en *Antibody Engineering*, ed. por Capra, J.D., *Chem. Immunol. Basel*, Karger, 65 (1997) 111-128).

El perfilado de glicosilación de un anticuerpo monoclonal recombinante terapéutico con dos sitios de glicosilación unidos a N, empleando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo, está descrito en Lim, A. y otros, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 163-172. Nandakumar, K.S. y Holmdahl, R., *Trends. Immunol.* 29 (2008) 173-178, revelan la posibilidad de dividir o modificar IgG *in vivo* mediante inyección de

enzimas. La proteasa estreptocócica IdeS modula la fijación bacteriana a IgGFc y genera fragmentos 1/2Fc capaces de cebar leucocitos polimorfonucleares, tal como describen Söderberg, J.J. y von Pawel-Rammingen, U., Mol. Immunol. 45 (2008) 3347-3353. Bennet, K.L. y otros, Anal. Biochem. 245 (1997) 17-27, describen el control de la digestión con papaína derivada de un anticuerpo monoclonal, utilizando espectrometría de masas por electrospray.

Resumen de la presente invención

Un aspecto de la presente invención consiste en un método para determinar el patrón de glicosilación, o el patrón de glicosilación específico del sitio, de una inmunoglobulina humana de la subclase IgG1 (hulgG1) o IgG2 (hulgG2) o IgG4 (hulgG4), que comprende las siguientes etapas:

- a) división de la inmunoglobulina en fragmentos por digestión enzimática con el enzima IdeS y tratamiento de los fragmentos de inmunoglobulina con carboxipeptidasa B,
- ab) tratamiento de la inmunoglobulina digerida en la etapa a) con ácido fórmico y TCEP,
- b) separación de los fragmentos de inmunoglobulina obtenidos en a), utilizando cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento,
- c) análisis de los fragmentos de inmunoglobulina separados en b) por espectrometría de masas realizada en ausencia de ácido trifluoroacético, y
- d) determinación del patrón de glicosilación de la inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en c).

En una forma de ejecución el método según la presente invención comprende las etapas b) y c):

- b) desalar los fragmentos de inmunoglobulina mediante una cromatografía de exclusión de tamaños,
- c) analizar directamente los fragmentos desalados por espectrometría de masas.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a un método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina humana de la subclase IgG1 (hulgG1) o IgG2 (hulgG2) o IgG4 (hulgG4), utilizando el enzima IdeS y el análisis por espectrometría de masas.

Se ha encontrado que el uso de IdeS proporciona una división altamente reproducible, incluso en condiciones no reductoras. Asimismo se puede omitir la adición de TFA (ácido trifluoroacético) para el análisis espectrométrico de masas, es decir, la espectrometría de masas se realiza en ausencia de ácido trifluoroacético. Además no se limita el uso de IdeS, p.ej. se puede utilizar para digerir una inmunoglobulina en solución.

La técnica ESI-MS suele realizarse al nivel de la inmunoglobulina intacta o de cadena pesada de inmunoglobulina y en el caso de proteínas grandes proporciona una menor resolución de masas. El análisis mediante ESI-MS de las inmunoglobulinas digeridas por papaína es limitado debido a la baja especificidad del enzima y a la necesidad de cisteína para activarlo, lo cual produce formación de productos secundarios, es decir artefactos que interfieren en el análisis de los datos, p.ej. por reacciones de reducción. La técnica de mapeo de péptidos requiere una preparación de muestra relativamente complicada y el análisis cuantitativo es difícil porque, entre otras cosas, se forman aductos salinos.

Generalmente todos los métodos cromatográficos requieren el marcaje de las sustancias; la coelución de ciertos glicanos es inevitable. Además no se puede distinguir el patrón de glicosilación de las inmunoglobulinas glicosiladas en los fragmentos Fc y Fab.

Un "polipéptido" es un polímero formado por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Se puede producir enzimática o sintéticamente. Los polipéptidos que llevan menos de 20 aminoácidos también se designan como "péptidos". Una "proteína" es una macromolécula que contiene dos o más polipéptidos o un polipéptido que está compuesto por más de 100 aminoácidos. Un polipéptido también puede contener componentes no peptídicos como p.ej. carbohidratos. Las modificaciones no peptídicas son introducidas por la célula que expresa el polipéptido y por consiguiente dependen del tipo de célula. En esta solicitud de patente los polipéptidos están definidos por su secuencia de aminoácidos. Las modificaciones – como las de carbohidratos – no están descritas explícitamente, pero siempre pueden estar presentes.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", utilizados como sinónimos en esta solicitud de patente, denotan una molécula que contiene al menos dos cadenas ligeras de polipéptido (cadena ligera, CL) y dos cadenas pesadas de polipéptido (cadena pesada, CP). Cada una de las cadenas ligeras y pesadas comprende una región variable (normalmente el extremo amínico de la cadena) que contiene dominios de fijación de un antígeno. Cada una de las cadenas ligeras y pesadas comprende una región constante (normalmente el extremo carboxílico de la cadena) que interviene en la fijación del anticuerpo a diferentes receptores. Una cadena ligera se compone normalmente de un dominio variable V_L y de un dominio constante C_L . Una cadena pesada se compone normalmente de un dominio variable V_P y de una región constante que a su vez comprende los dominios C_{P1} , bisagra, C_{P2} , C_{P3} y opcionalmente

5 CP4. Los anticuerpos puede existir en numerosas formas, p.ej. como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂, y también como cadenas simples (scFv) (p.ej. Huston, J.S. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E. y otros, Science 242 (1988) 423-426; y Hood, L. E. y otros, Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984) y Hunkapiller, T. y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16). Las inmunoglobulinas se dividen en clases según la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Además algunas de estas clases se dividen a su vez en subclases (isotipos), p.ej. la IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 o la IgA en IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de las cadenas pesadas se designan como α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) y μ (IgM) según la clase a la que pertenece el anticuerpo.

10 Los métodos generales de cromatografía son conocidos del especialista en la materia, p.ej. Chromatography, 5ª edición, Part 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, R.K., Protein Purification: Principles and Practice (1982);
15 Sambrook, J. y otros (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. y otros (eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

20 Se ha visto que el enzima IdeS que degrada la inmunoglobulina – una cisteína proteasa que divide las IgG muy específicamente en el motivo GP(S) – puede usarse en combinación con LC-MS (cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas) para identificar detalladamente el patrón de glicosilación de las inmunoglobulinas específico del sitio.

25 Se ha visto que en un procedimiento de digestión de dos horas el IdeS divide anticuerpos dando dos fragmentos CP-Fc, también denominados fragmento CP-Fc (que comprende las partes C-terminales de las cadenas pesadas de inmunoglobulina) y el fragmento Fab₂, también denominado fragmento Fab₂ (que comprende las partes N-terminales de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de inmunoglobulina). Este método es especialmente adecuado para el análisis del patrón de glicosilación de las inmunoglobulinas glicosiladas en el fragmento Fc o glicosiladas en los fragmentos Fc y Fab₂. Para analizar un sitio de glicosilación secundario se puede reducir la digestión con IdeS. Con este método también se pueden analizar productos de degradación. Después del tratamiento enzimático se somete la muestra a un análisis LC-MS que comprende una cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento (RP-HPLC) y un análisis en línea por MS con un aparato QTOF (espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo). El método según la presente invención puede emplearse p.ej. para identificar lotes, controlar las etapas sucesivas de un proceso y también los procesos de fermentación, incluso sin eliminar la muestra.

35 El motivo GP(S) en la región N-terminal del dominio C_H2 de las inmunoglobulinas es esencial para la digestión con IdeS. Tal como se usa aquí, el término fragmento CP-Fc se refiere al fragmento C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina obtenida por digestión con IdeS y el término fragmento Fab₂ al fragmento N-terminal de una inmunoglobulina, incluyendo todas las cadenas ligeras obtenidas por digestión con IdeS. Por tanto, en una forma de ejecución, el método según la presente invención sirve para caracterizar IgG quimérica o humanizada, es decir inmunoglobulinas humanas o humanizadas de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4, o de una variante de ellas. En una forma de ejecución la digestión se efectúa a pH ligeramente básico durante dos horas. En una forma de ejecución, para analizar el patrón de glicosilación en el fragmento Fab₂ se lleva a cabo durante media hora una etapa adicional de reducción en condiciones ácidas, utilizando TCEP. Luego la muestra se somete a análisis por LC-MS tal como se describe más abajo en los ejemplos.

45 En contraste con el análisis del patrón de glicosilación al nivel de cadena pesada de inmunoglobulina intacta, o incluso de inmunoglobulina intacta, se ha encontrado que el método de la presente invención es ventajoso porque determina las masas con mayor exactitud, resolución y sensibilidad. Respecto a otros enzimas como la papaína o a la digestión limitada con LysC, el IdeS tiene la ventaja de poseer un sitio único de escisión y por consiguiente ser muy específico y dividir las distintas subclases con eficiencia similar. No hay riesgo de división excesiva y no hace falta cisteína para activar el enzima. Para analizar los productos de degradación se reduce la digestión con IdeS, a fin de obtener tres fragmentos de anticuerpo: la cadena ligera completa de inmunoglobulina, dos fragmentos Fab de cadena pesada (fragmento CP Fab) y el fragmento Fc de cadena pesada (fragmento CP Fc). Las tres especies se pueden separar por cromatografía y analizar individualmente. Este método constituye una vía fácil y rápida para determinar si en los fragmentos Fc o Fab de una inmunoglobulina existen o han ocurrido degradaciones tales como oxidación, desamidación o fragmentación. Algunas reacciones de degradación, como p.ej. la oxidación, producen un ligero desplazamiento del tiempo de retención y por tanto son utilizables para controlar muestras procedentes de estudios de formulación y estabilidad mediante detección por absorción de UV, lo cual también es un aspecto de la presente invención. En una forma de ejecución los métodos según la presente invención incluyen una etapa de desalinización mediante el uso de una cromatografía de exclusión de tamaños acoplada directamente a un análisis espectrométrico de masas de la mezcla molecular desalada.

60 División específica de inmunoglobulinas

65

Las inmunoglobulinas monoclonales son proteínas muy grandes y además extremadamente heterogéneas (microheterogeneidad) debido a las glicoestructuras de sus cadenas pesadas. Para examinar el patrón de glicosilación de las inmunoglobulinas en cuanto a la formación de productos de degradación y/o modificaciones, es conveniente dividir las inmunoglobulinas en fragmentos más pequeños antes de analizar la glicoestructura.

5

División de los puentes de disulfuro

Todos los puentes de disulfuro que existen en una molécula de inmunoglobulina se pueden dividir por reducción. Durante la reducción se obtienen libres las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina. La tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) es un agente reductor que se usa con frecuencia, porque todos los puentes de disulfuro de una inmunoglobulina se escinden completamente en un corto periodo de tiempo y la reducción tiene lugar en todo el intervalo de pH (véase p.ej. Hau, J.C. y Hau, C.Y., Anal. Biochem. 220 (1994) 5-10). En una forma de ejecución el intervalo de pH va de 1,5 hasta 8,5. El ditiotreitól (DTT) también se distingue por una rápida división de los puentes de disulfuro; sin embargo la reducción con DTT en un medio ácido avanza muy poco. Normalmente se necesita una etapa de desnaturalización para completar la disociación de la cadena pesada y ligera. Además la desnaturalización hace los grupos disulfuro más accesibles. En una forma de ejecución la desnaturalización puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de guanidina/HCl o ácido fórmico.

10

15

División enzimática

20

La papaína, una cisteína proteasa, parte los enlaces peptídicos bastante inespecíficamente tras arginina (R), lisina (K), ácido glutámico (E), histidina (H), glicina (G) y tirosina (Y). Si el periodo de incubación es suficiente o demasiado largo, la digestión con papaína hidroliza totalmente la inmunoglobulina. No obstante las inmunoglobulinas pueden dividirse de manera relativamente selectiva en su región bisagra mediante una proteólisis limitada (Lottspeich, F. y Engels, J.W., Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag, Munich, 2ª edición (2006) 201-214). La división tiene lugar en el lado N-terminal de los puentes de disulfuro que unen las dos cadenas pesadas. En este proceso se conservan los puentes de disulfuro, con lo cual se obtienen tres fragmentos (2 fragmentos Fab y un fragmento Fc). Los dos fragmentos N-terminales se conocen como fragmentos de fijación de antígenos (fragmento Fab, Fab, fragmento fijador de antígenos) y el fragmento Fc como fragmento cristalino (fragmento Fc, Fc, fragmento cristalizante). Cada fragmento Fab se compone de una cadena ligera completa y de la mitad amino-terminal de la cadena pesada. El fragmento Fc se compone de dos mitades carboxi-terminales de las cadenas pesadas que aún se mantienen unidas entre sí por un puente de disulfuro.

25

30

El IdeS (enzima de *S. pyogenes* que degrada la inmunoglobulina G) es una cisteína proteasa celular que se puede aislar de la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*. Este enzima divide la IgG humana con gran especificidad, directamente antes de la secuencia GP(SVFLFP), es decir del motivo GP(S). Esta secuencia está localizada en el lado C-terminal de los puentes de disulfuro que unen entre sí las dos cadenas pesadas (CP). La escisión produce los extremos C-terminales de las dos cadenas pesadas (2 fragmentos CP-Fc) y un fragmento Fab₂ que incluye el fragmento Fab de las cadenas ligeras y pesadas unidas por puentes de disulfuro (figura 1) (von Pawel-Rammingen, U., y otros, EMBO Journal 21 (2002) 1607-1615). Si los fragmentos resultantes de la división de la inmunoglobulina por IdeS se reducen con DTT o TCEP tras la digestión, se obtienen las dos cadenas ligeras del anticuerpo (2 CL) y los fragmentos N-terminales de las cadenas pesadas (2 fragmentos CP Fab) en lugar del fragmento Fab₂. Los extremos C-terminales de la cadena pesada (CP-Fc) no quedan afectados por la reducción.

35

40

El enzima papaína, empleado en general para dividir la inmunoglobulina, escinde el N-terminal de la región bisagra. Por consiguiente la digestión con papaína requiere la reducción y en el espectro de masas los tres fragmentos del anticuerpo (Fc, CL y CP Fab) aparecen en el mismo intervalo de m/z.

45

El primer aspecto de la presente invención consiste en un método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina humana o humanizada de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4 o de una variante de las mismas, que comprende las siguientes etapas:

50

- a) dividir dicha inmunoglobulina en fragmentos por digestión enzimática con el enzima IdeS y tratar dicha inmunoglobulina con carboxipeptidasa B,
- b) tratar dicha inmunoglobulina escindida enzimáticamente con ácido fórmico y TCEP,
- c) separar los fragmentos escindidos enzimáticamente por la digestión enzimática mediante cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento,
- d) analizar los fragmentos de inmunoglobulina separados en la etapa c) por espectrometría de masas realizada en ausencia de ácido trifluoroacético, y
- e) determinar el patrón de glicosilación de la inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en la etapa d).

55

60

Se ha encontrado que el uso del enzima IdeS – con capacidad de división específica – en vez de p.ej. una proteólisis limitada con LysC o papaína permite obtener fragmentos definidos de inmunoglobulinas que son muy adecuados para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina.

65

Tal como se usa en esta solicitud de patente, el término “patrón de glicosilación” se refiere a los oligosacáridos como un todo que está unido a uno o más restos especificados de aminoácido en una inmunoglobulina. Debido a la heterogeneidad de glicosilación de una célula, una inmunoglobulina producida de forma recombinante no solo comprende un único oligosacárido concreto unido en N- u O- a un resto especificado de aminoácido, sino que es una mezcla de polipéptidos que poseen la misma secuencia de aminoácidos pero con oligosacáridos de distinta composición en la posición aminoácida especificada. Por consiguiente el término anterior designa un grupo de oligosacáridos que están unidos a o más posiciones de aminoácido especificadas en una inmunoglobulina producida de forma recombinante, es decir la heterogeneidad del oligosacárido acoplado. Tal como se usa en esta solicitud de patente, el término “oligosacárido” denota un sacárido polímero que comprende dos o más monosacáridos unidos por enlace covalente.

En el método según la presente invención la inmunoglobulina cuyo patrón de glicosilación debe determinarse se digiere / divide enzimáticamente en una primera etapa con el enzima IdeS para obtener un fragmento CP Fc y un fragmento Fab₂. Cuando hay que determinar el patrón de glicosilación de un sitio de glicosilación en el fragmento Fab₂ se efectúa una reducción de los enlaces disulfuro de la inmunoglobulina con un agente reductor. Después de la división enzimática y de la etapa de reducción se acidifica la solución para inducir la disociación de los fragmentos Fc de cadena pesada. La acidificación se lleva a cabo en la misma etapa de reducción de los enlaces disulfuro de la inmunoglobulina. Los fragmentos obtenidos se separan por HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Para determinar el patrón de glicosilación, la muestra que contiene los fragmentos Fc de cadena pesada disociados y opcionalmente los fragmentos Fab₂ o Fab de la inmunoglobulina se somete a un análisis espectrométrico de masas (MS). Con los resultados del análisis MS se determina el patrón de glicosilación de la inmunoglobulina. En una forma de ejecución el análisis MS se efectúa en una etapa separada de la RP-HPLC (fuera de línea). En una forma de ejecución el análisis MS tiene lugar directamente tras la RP-HPLC (en línea), es decir el eluyente de la RP-HPLC se introduce directamente en el equipo de MS.

En el método fuera de línea la determinación del patrón de glicosilación de Fc incluye una etapa de desalinización por CET (cromatografía de exclusión de tamaños) y la entrada directa de la muestra en el espectrómetro de masas. Este método es extremadamente rápido y capaz de grandes rendimientos y ventajas por la alta resolución, exactitud y sensibilidad del análisis de oligosacáridos al nivel del fragmento CP Fc de las inmunoglobulinas. En el espectro de masas el fragmento CP Fc glicosilado aparece en el intervalo de m/z comprendido entre 800 y 2000 (véase p.ej. la figura 2), mientras que el fragmento Fab₂, debido a su doble peso, aparece en el intervalo de m/z comprendido entre 1900 y 3000 (véase p.ej. la figura 3). Por tanto los dos fragmentos de la inmunoglobulina se pueden separar por espectrometría de masas, lo cual facilita la interpretación de los datos.

Aquí pues se presenta un método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina humana o humanizada de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4 o de una inmunoglobulina murina de la subclase IgG2a, IgG2b o IgG3 o de una variante de las mismas, que comprende las siguientes etapas:

- a) digerir la inmunoglobulina por tratamiento con el enzima IdeS,
- b) desalar mediante una cromatografía de exclusión de tamaños los fragmentos de inmunoglobulina escindidos enzimáticamente por la digestión enzimática,
- c) analizar por espectrometría de masas los fragmentos de inmunoglobulina separados en la etapa b), y
- d) determinar el patrón de glicosilación de la inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en la etapa c).

Los métodos según la presente invención incluyen como etapa a) la etapa siguiente:

- a) digestión de la inmunoglobulina por tratamiento con el enzima IdeS y con el enzima carboxipeptidasa B.

La inmunoglobulina es dividida por el enzima IdeS para obtener los fragmentos CP Fc y Fab₂ y en la misma etapa se elimina la lisina C-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina con el fin de reducir la heterogeneidad de la inmunoglobulina, es decir, para obtener una muestra más homogénea sin alterar el patrón de glicosilación.

Tal como se emplea en esta solicitud de patente, el término “fragmento Fab₂” designa la parte N-terminal de una inmunoglobulina obtenida por división enzimática con el enzima IdeS. Tal como se usa en esta solicitud de patente, el término “fragmento CP Fc” designa las partes C-terminales de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina que se obtienen por división enzimática con el enzima IdeS. Este fragmento comprende dos polipéptidos no unidos por enlace covalente, es decir el fragmento C-terminal de cada una de las cadenas pesadas. Como el enzima IdeS parte la inmunoglobulina por una posición diferente a donde lo hacen los enzimas papaína y pepsina - y solo en un sitio único de la inmunoglobulina –se obtienen exclusivamente dos fragmentos bien definidos de una inmunoglobulina.

El método comprende una etapa a1) después de la etapa a) y antes de la etapa b), que consiste en:

- a1) tratar con ácido fórmico los fragmentos de inmunoglobulina escindidos enzimáticamente por la digestión enzimática de la etapa a).

El fragmento Fc resultante de la división de la inmunoglobulina por el enzima IdeS, que comprende polipéptidos no unidos entre sí por enlace covalente, se separa en dos fragmentos pFc. Tal como se emplea en esta solicitud de patente, el término "fragmento pFc" designa cada uno de los polipéptidos C-terminales obtenidos de una cadena pesada de inmunoglobulina tras su división enzimática con el enzima IdeS.

La etapa a1) del método según la presente invención consiste en:

a1) tratar con ácido fórmico y un agente reductor los fragmentos de inmunoglobulina escindidos enzimáticamente por la digestión enzimática de la etapa a).

El fragmento Fab₂ obtenido tras la división enzimática de la inmunoglobulina con el enzima IdeS se separa a su vez en dos fragmentos Fab reduciendo los enlaces disulfuro que los unen. El ácido fórmico y el agente reductor se añaden al mismo tiempo. Dicho agente reductor es una solución de TCEP. El ácido fórmico y la solución de TCEP se añaden antes de la incubación, de modo que ambos componentes están presentes en una sola etapa.

El método según la presente invención comprende la incubación de una muestra que contiene una inmunoglobulina cuyo patrón de glicosilación debe determinarse mediante diferentes enzimas y agentes. Estos compuestos y agentes se usan para convertir la inmunoglobulina que lleva la muestra en fragmentos definidos. En una forma de ejecución del método la cisteína proteasa IdeS específica de la IgG es el IdeS procedente de *Streptococcus pyogenes* o de *Treponema denticola*. En otra forma de ejecución preferida la cisteína proteasa IdeS específica de la IgG tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 1. En una forma de ejecución la división enzimática con la cisteína proteasa IdeS específica de la IgG tiene lugar en un intervalo de pH entre 5,5 y 8,5. En una forma de ejecución la división enzimática tiene lugar en el intervalo de pH entre 7,0 y 8,0. También se encontró que la relación molar de cisteína proteasa IdeS específica de IgG a molécula de inmunoglobulina debería estar comprendida entre 1:25 y 1:2500, en otra forma de ejecución entre 1:25 y 1:100.

En una forma de ejecución del método según la presente invención, el producto eluido de la cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento o de la cromatografía de exclusión de tamaños se hace pasar directamente al espectrómetro de masas.

Cuando hay que determinar el patrón de glicosilación del fragmento Fab de una inmunoglobulina, el método consta de las siguientes etapas:

- a) digerir la inmunoglobulina por tratamiento con el enzima IdeS,
- b) tratar con ácido fórmico y un agente reductor la inmunoglobulina escindida enzimáticamente en la etapa a),
- c) separar mediante cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento los fragmentos obtenidos de dicha inmunoglobulina y/o desalarlos por cromatografía de exclusión de tamaños,
- d) analizar los fragmentos de inmunoglobulina separados en la etapa c) mediante una espectrometría de masas, infundiéndolos directamente en un espectrómetro de masas, y
- e) determinar el patrón de glicosilación de la inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en la etapa d).

Aquí se revela un método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina humana o humanizada, obtenida de forma recombinante, de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4 o de una inmunoglobulina murina de la subclase IgG2a, IgG2b o IgG3, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una muestra de la inmunoglobulina producida de forma recombinante,
- b) digerir la inmunoglobulina por tratamiento con el enzima IdeS,
- c) tratar con ácido fórmico y un agente reductor la inmunoglobulina escindida enzimáticamente en la etapa b),
- d) separar mediante cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento los fragmentos obtenidos de dicha inmunoglobulina y/o desalarlos por cromatografía de exclusión de tamaños,
- e) analizar los fragmentos de inmunoglobulina separados en la etapa d) mediante una espectrometría de masas, infundiéndolos directamente en un espectrómetro de masas, y
- f) determinar el patrón de glicosilación de la inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en la etapa e).

Aquí se revela un método para producir un fragmento Fab₂ o Fab de una inmunoglobulina humana o humanizada de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4 o de una inmunoglobulina murina de la subclase IgG2a, IgG2b o IgG3, que consta de las siguientes etapas:

- a) preparar una inmunoglobulina, a partir de la cual debe obtenerse el fragmento Fab₂ o Fab,
- b) dividir dicha inmunoglobulina por digestión con el enzima IdeS,
- c) si el fragmento Fab debe producirse tratando con ácido fórmico y un agente reductor dicha inmunoglobulina escindida enzimáticamente en la etapa b),
- d) producir dicho fragmento Fab₂ o dicho fragmento Fab mediante una cromatografía de proteína A o una resina de exclusión de tamaños.

5 Para purificar inmunoglobulinas heterólogas producidas de forma recombinante se emplea frecuentemente una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. En una forma de ejecución, a una cromatografía de afinidad de proteína A le sigue una o dos etapas adicionales de separación cromatográfica, p.ej. de cromatografía de intercambio iónico. La etapa final de purificación es una llamada “etapa de refinado” para eliminar las trazas de impurezas y contaminantes tales como inmunoglobulinas agregadas, HCP (proteína de célula huésped) residual, ADN (ácido nucleico de célula huésped), virus y/o endotoxinas. Para esta etapa de refinado se usa frecuentemente un material cromatográfico de intercambio aniónico en modalidad de flujo continuo.

10 Para la recuperación y purificación de proteínas hay distintos métodos bien establecidos y ampliamente usados, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (p.ej. cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), cromatografía de intercambio iónico (p.ej. de intercambio catiónico (resinas carboximetílicas), aniónico (resinas aminoetílicas) y de modo mixto), adsorción tiofílica (p.ej. con beta-mercaptoetanol u otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o de adsorción aromática (p.ej. con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (p.ej. con material de afinidad por Ni (II) y Cu (II)), cromatografía de exclusión de tamaños y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

20 En una forma de ejecución el método consiste en cultivar una célula eucariota que lleva un ácido nucleico capaz de codificar la inmunoglobulina en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina heteróloga. El término “en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina” se refiere a las condiciones empleadas para el cultivo de una célula de mamífero que expresa una inmunoglobulina y que son conocidas o pueden ser fácilmente determinadas por un especialista en la materia. El especialista en la materia también sabe que estas condiciones pueden variar según el tipo de célula de mamífero cultivada y el tipo de célula de inmunoglobulina expresada. En general la célula de mamífero se cultiva a una temperatura entre 20°C y 40°C, p.ej., y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción proteica efectiva de la inmunoglobulina, p.ej. de 4 hasta 28 días.

30 Aquí se presenta un método para controlar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina producida de forma recombinante, utilizando el método según la presente invención.

Asimismo se presenta un método para producir una proteína, que incluye la etapa de:

35 a) escindir enzimáticamente con el enzima IdeS una proteína fusionada con inmunoglobulina para obtener la proteína.

Los siguientes ejemplos, la lista de secuencias y las figuras se ofrecen como ayuda para entender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de la lista de secuencias

- 40 SEQ ID N°: 1 secuencia de aminoácidos del IdeS procedente de Streptococcus pyogenes.
 SEQ ID N°: 2 secuencia de inmunoglobulina murina IgG2a desde C_H1 hasta C_H2.
 SEQ ID N°: 3 secuencia de inmunoglobulina murina IgG3 desde C_H1 hasta C_H2.
 SEQ ID N°: 4 región constante de IgG1 humana.
 45 SEQ ID N°: 5 región constante de IgG4 humana.

Descripción de las figuras

- Figura 1 representación de la digestión de inmunoglobulinas IgG1 con IdeS.
 50 Figura 2 espectro de masas de IgG1 humana analizada por CET e infusión directa en el espectrómetro de masas. El espectro solo muestra el fragmento Fc glicosilado.
 Figura 3 espectro de masas de IgG1 humana analizada por CET e infusión directa en el espectrómetro de masas. El espectro solo muestra el fragmento Fc glicosilado y el fragmento Fab₂.
 Figura 4 cromatograma de la inmunoglobulina IgG3 murina digerida con IdeS y reducida.
 55 Figura 5 ampliación del espectro de masas del fragmento Fab de cadena pesada, con O-glicosilación en la región bisagra de la inmunoglobulina IgG3 murina.
 Figura 6 ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada, con N-glicosilación de la inmunoglobulina IgG3 murina.
 Figura 7 espectro de masas deconvuelto del péptido tríptico O-glicosilado (IPKPSTPPGSSCPPGNILGGPSV-FIFPPKPK (CP = cadena pesada, aminoácido (aa) 217-247; S y T: sitios posibles de O-glicosilación) obtenido de LC-MS.
 60 Figura 8 cromatograma de la inmunoglobulina IgG4 humanizada digerida con IdeS.
 Figura 9 ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada, con N-glicosilación de la inmunoglobulina IgG4 humanizada.
 65 Figura 10 cromatograma de la inmunoglobulina IgG1 humanizada digerida con IdeS.

- Figura 11 ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada, con N-glicosilación de la inmunoglobulina IgG1 humanizada.
- Figura 12 superposición de los cromatogramas de inmunoglobulina IgG1 humanizada digerida con IdeS extraída del sobrenadante de un cultivo y de una muestra purificada de proteína A.
- 5 Figura 13 superposición de los espectros de masas de inmunoglobulina IgG1 humanizada digerida con IdeS extraída del sobrenadante de un cultivo y de una muestra purificada de proteína A (tiempo de retención: 16,8 minutos).
- Figura 14 superposición ampliada de los espectros de masas de inmunoglobulina IgG1 humanizada digerida con IdeS extraída del sobrenadante de un cultivo y de una muestra purificada de proteína A (tiempo de retención: 16,8 minutos).
- 10 Figura 15 superposición analítica de los cromatogramas de exclusión de tamaños de la inmunoglobulina completa, del fragmento Fab₂ y del estándar.

Ejemplo 1

- 15 Determinación de la concentración de anticuerpo:
- La concentración de anticuerpo se determinó midiendo la absorción a 280 nm en un espectrofotómetro del tipo UVIKON XL (Goebel Company). El coeficiente de extinción del anticuerpo empleado fue de 1,55 ml/(mg*cm) y se calculó según el método de Pace, C.N. y otros, (Protein Sci. 4 (1995) 2411-2423).
- 20

Ejemplo 2

- 25 Método general A (para IgG1, IgG3)
- Digestión con IdeS para analizar el patrón de glicosilación en el fragmento Fc:
- Se diluyen 100 µg (0,66 nmoles) de inmunoglobulina hasta una concentración final de 1 mg/ml en tampón de TRIS/HCl 50 mM de pH 8,0 y se añaden 2 µl (c = 1 mg/ml, 0,06 nmoles) de enzima degradador de inmunoglobulina (IdeS, PM 345890 Da) para tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:50 en peso. La solución se incuba durante 2 hasta 5 h a 37°C, dependiendo de la inmunoglobulina utilizada. Para el análisis por cromatografía de exclusión de tamaños e infusión directa en el espectrómetro de masas se para la actividad del enzima añadiendo a la solución un volumen igual de ácido fórmico al 1%.
- 30
- 35 Reducción de la inmunoglobulina digerida con IdeS para el análisis adicional del patrón de glicosilación en el fragmento Fab:
- Para la reducción se diluye una mitad de la muestra con 64 µl de tampón de fosfato potásico 100 mM de pH 7,0 a fin de llegar a un volumen final de 115 µl. Luego se disuelven 60 µl de TCEP (tris(2-carboxietil) fosfina, Pierce) 0,5 M en un volumen de hidrocloreuro de guanidina 4 M y se agregan 50 ml de hidrocloreuro de guanidina 8 M. Después se incuba la muestra durante 30 minutos 37°C. La reacción se para añadiendo 5 ml de ácido fórmico al 20% (v/v).
- 40

Ejemplo 3

- 45 Método general B (para IgG1, IgG3, IgG4)
- Digestión combinada con IdeS y CpB:
- Se diluyen 100 µg (0,66 nmoles) de inmunoglobulina hasta una concentración final de 1 mg/ml en tampón de TRIS/HCl 50 mM de pH 8,0 y se añaden 2 µl (c = 1 mg/ml, 0,06 nmoles) de enzima degradador de inmunoglobulina (IdeS, PM 345890 Da) para tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:50 en peso. La solución se incuba durante 2 hasta 5 h a 37°C, dependiendo de la inmunoglobulina utilizada. 30 minutos antes de finalizar la incubación con IdeS se agrega a la solución 1 µl (1 mg/ml) de carboxipeptidasa B (CpB, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:25 en peso.
- 50
- 55

Ejemplo 4

- Método general C (para IgG con patrón de glicosilación complejo)
- 60 Digestión combinada con IdeS y EndoH:
- Se diluyen 25 µg (0,17 nmoles) de inmunoglobulina hasta una concentración final de 0,5 mg/ml en tampón de fosfato sódico de pH 6,0, se añaden 2,5 µl (c = 2,5 U/500 µl) de endoglicosidasa H (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se incuba durante 18 h a 37°C para escindir las estructuras de oligosacárido. A continuación se ajusta el pH a 8,0 añadiendo 25 µl de tampón de TRIS/HCl 0,1 M de pH 8,0. La división de la inmunoglobulina se consigue
- 65

ES 2 535 963 T3

agregando 0,5 μ l (c = 1 mg/ml, 0,02 nmoles) de enzima degradador de inmunoglobulina (IdeS, PM 345890 Da) e incubando durante 2 h a 37°C.

Ejemplo 5

5 Método general D (para sobrenadantes de cultivo):

Digestión combinada con IdeS y CpB:

10 50 μ g (0,33 nmoles) de un sobrenadante del cultivo de una célula eucariota que expresa inmunoglobulina se centrifugan durante 3 minutos a 10.800 de fcr (fuerza centrífuga relativa) y se diluyen hasta un concentración final de 0,7 mg/ml en tampón TRIS/HCl 50 mM de pH 8,0. Se añade 1 μ l (c = 1 mg/ml, 0,06 nmoles) de enzima degradador de inmunoglobulina (IdeS, PM 345890 Da) para tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:50 en peso. La solución se incuba durante 2 hasta 5 h a 37°C, dependiendo de la inmunoglobulina utilizada. 30 minutos antes del
15 finalizar la incubación con IdeS se adiciona a la solución 1 μ l (1 mg/ml) de carboxipeptidasa B (CpB, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:25 en peso.

Ejemplo 6

20 Método RP-HPLC-MS

La LC-MS se efectúa en un aparato Agilent Cap LC1100 acoplado a QTOF II (Micromass/Waters). La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna Phenomenex Jupiter C18 (tamaño de partícula 5 μ m, tamaño de poro 300 Å, columna de 1 x 250 mm). El eluyente A es ácido fórmico al 0,5%; el eluyente B es 70% de isopropanol, 20% de acetonitrilo, 9,5% de agua y 0,5% de ácido fórmico. El caudal es de 40 μ l/min, la separación se efectúa a
25 75°C y en la columna se inyectan 2 μ g (10 μ l) de inmunoglobulina obtenida mediante un método según uno de los ejemplos 2 a 5. Se aplica el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	20
7	20
9	25
29	50
32	100
37	100
38	20
50	20

30 Durante los primeros 7 minutos el producto eluido se desecha para evitar que la fuente iónica del espectrómetro de masas se contamine con sales. Se registra la señal de UV a 280 nm (referencia 360 nm). Los espectros de MS se obtienen utilizando un voltaje capilar de 2.700 V, un voltaje de cono de 30 V en un intervalo de masa de 600 hasta 2000 m/z en modo de ion positivo, a una temperatura de desolvatación de 120°C y una temperatura de la fuente de
35 80°C. Los datos de MS se recogen entre los 7 y 50 minutos.

Ejemplo 7

40 Glicoanálisis por infusión directa del anticuerpo escindido con IdeS

Cromatografía de exclusión de tamaños:

En una columna ECO SR (5 x 250 mm) (KronLab) autoempaquetada con Sephadex G25 y equilibrada con ácido fórmico al 2%, acetonitrilo al 40%, a un caudal de 0,5 ml/min durante 30 minutos, se inyectan 45 μ g (90 μ l) de inmunoglobulina escindida con IdeS mediante un método según uno de los ejemplos 2 a 5. La proteína se desala aplicando una elución isocrática de 8 minutos con ácido fórmico al 2%, acetonitrilo al 40%, a un caudal de 1 ml/min. La elución de la proteína desalada se registra por UV (280 nm), recogiendo la muestra en placas de microvaloración mediante un colector de fracciones. Las placas de microvaloración se pueden insertar en un sistema TriversaNano-Mate (Advion) y los espectros de MS se registran automáticamente, o la muestra se puede pipetear manualmente con agujas de vidrio recubiertas de metal (Proxeon Biosystems Nano ESI-needles, nº de catálogo ES387) y atomizar en el espectrómetro de masas.

Parámetros de MS para la infusión directa en un aparato QTOF II (Micromass/Waters):

5 Los espectros de MS se obtienen usando un voltaje capilar de 800 V, un voltaje de cono de 33 V en un intervalo de masa de 600 a 2000 m/z (fragmento Fc glicosilado) en modo de ion positivo, a una temperatura de desolvatación de 120°C y una temperatura de la fuente de 80°C. Los datos de MS se recogen durante aprox. 2 minutos.

Ejemplo 8

10 Glicoanálisis de una inmunoglobulina IgG3 murina

En este ejemplo el método de la presente invención se ha ilustrado con una inmunoglobulina IgG3 murina. Esta inmunoglobulina posee dos sitios de glicosilación, uno en el fragmento Fab y el otro en el fragmento Fc.

15 En la figura 4 se representa el cromatograma de una inmunoglobulina IgG3 murina digerida con IdeS y reducida. En la figura 5 se representa una ampliación del espectro de masas del fragmento Fab de cadena pesada con la O-glicosilación en la región bisagra, mientras que en la figura 6 se muestra una ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada con el sitio de N-glicosilación. En la figura 7 se representa un espectro de masas deconuelto del péptido triptico O-glicosilado, con el patrón de glicosilación.

20

Ejemplo 9

Glicoanálisis de una inmunoglobulina IgG4 humanizada

25 En este ejemplo el método de la presente invención se ha ilustrado con una inmunoglobulina humanizada que comprende una región constante de inmunoglobulina IgG4 humana. Esta inmunoglobulina posee un sitio de N-glicosilación en el fragmento Fc.

30 En la figura 8 se muestra el cromatograma de la inmunoglobulina IgG4 humanizada digerida con IdeS. En la figura 9 se muestra una ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada con el sitio de N-glicosilación.

35

Ejemplo 10

35 Glicoanálisis de una inmunoglobulina IgG1 humanizada

En este ejemplo el método de la presente invención se ha ilustrado con una inmunoglobulina humanizada que comprende una región constante de inmunoglobulina IgG1 humana. Esta inmunoglobulina posee un sitio de N-glicosilación en el fragmento Fc.

40

En la figura 10 se muestra el cromatograma de la inmunoglobulina IgG1 humanizada digerida con IdeS. En la figura 11 se muestra una ampliación del espectro de masas del fragmento Fc de cadena pesada con el sitio de N-glicosilación.

45 Ejemplo 11

Glicoanálisis de una inmunoglobulina IgG1 humanizada procedente de un sobrenadante de cultivo

50 En este ejemplo el método de la presente invención se ha ilustrado con una inmunoglobulina humanizada que comprende una región constante de inmunoglobulina IgG1 humana, cuya muestra para el análisis se obtuvo directamente de un sobrenadante de cultivo o de un cultivo sin posterior purificación. Esta inmunoglobulina posee un sitio de N-glicosilación en el fragmento Fc. Este ejemplo demuestra que el método de la presente invención puede utilizarse como herramienta en línea para controlar la glicosilación durante el cultivo de una célula eucariota.

55 En la figura 12 se presenta el cromatograma de la muestra digerida con IdeS procedente del sobrenadante de cultivo en comparación con una muestra purificada mediante una cromatografía de proteína A. Se puede apreciar que el fragmento Fc de cadena pesada es eluido en el mismo punto del cromatograma. El cromatograma de la muestra purificada por proteína A no contiene la cadena ligera de la inmunoglobulina, ya que dicha cadena ha sido eliminada durante la cromatografía de proteína A.

60

Ejemplo 12

Producción del fragmento Fab₂ de una IgG1 humanizada

65 Se diluyen 10 mg de inmunoglobulina hasta una concentración final de 1 mg/ml en tampón de TRIS/HCl 50 mM de pH 8,0 y se añaden 18 µl (c = 11,3 mg/ml) de enzima degradador de inmunoglobulina (IdeS, PM 345890 Da) para

5 tener una relación de enzima a inmunoglobulina de 1:50 en peso. La solución se incuba durante 0,5 hasta 2 h a 37°C con agitación. Inmediatamente después de la incubación con IdeS se llevó a cabo una cromatografía en columna de proteína A, utilizando una columna HP high trap de proteína A. El tampón A era solución salina con fosfato a pH 7,4 y el B tampón de citrato sódico 100 mM de pH 2,8 a un caudal de 1 ml/min. El fragmento Fab₂ se obtiene del flujo de la columna, mientras que el fragmento Fc se obtiene por elución con el tampón B. Las fracciones resultantes tienen una pureza del 84% al 95%, determinada por cromatografía de exclusión de tamaños. Se puede llevar a cabo otra etapa de purificación mediante una cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Superdex 75 HighLoad 16/60 de 120 ml de volumen. Como tampón se utilizó uno de fosfato sódico 20 mM con cloruro sódico 140 mM, de pH 6,0, a un caudal de 1 ml/min. Como apreciarse en la figura 15 el anticuerpo original completo se ha convertido en su fragmento Fab₂.

LISTA DE SECUENCIAS

15 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Análisis del patrón de glicosilación de inmunoglobulina
 <130> 25905 WO
 <150> EP09001757.5
 <151> 2009-02-09
 <160> 5
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes
 25 <400> 1

ES 2 535 963 T3

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 2 535 963 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

<210> 2
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

5

ES 2 535 963 T3

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

ES 2 535 963 T3

<210> 3
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

5

```

Thr Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys Ser Asp
1           5           10           15

Thr Ser Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
          20           25           30

Pro Glu Pro Val Thr Val Lys Trp Asn Tyr Gly Ala Leu Ser Ser Gly
          35           40           45

Val Arg Thr Val Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Phe Tyr Ser Leu Ser
          50           55           60

Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Ile
65           70           75           80

Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Glu Leu Ile Lys Arg Ile
          85           90           95

Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Cys Pro
          100          105          110

Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
          115          120          125

Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
130           135           140

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His Val Ser Trp Phe
145           150           155           160
    
```

ES 2 535 963 T3

Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln Pro Arg Glu Ala
 165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 180 185 190

Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

<210> 4
 <211> 330
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

10

ES 2 535 963 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 5
 <211> 327
 <212> PRT

5

ES 2 535 963 T3

<213> Homo sapiens
<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

ES 2 535 963 T3

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar el patrón de glicosilación de una inmunoglobulina humana o humanizada de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4, o de un fragmento Fab₂ de las mismas, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) división de dicha inmunoglobulina en fragmentos por digestión enzimática con el enzima IdeS y tratamiento de dicha inmunoglobulina con carboxipeptidasa B,
b) tratamiento con ácido fórmico y TCEP de dicha inmunoglobulina dividida enzimáticamente,
c) separación mediante cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento de los fragmentos de dicha inmunoglobulina obtenidos por digestión enzimática,
15 d) análisis por espectrometría de masas, realizada en ausencia de ácido trifluoroacético, de los fragmentos de dicha inmunoglobulina separados en la etapa c), y
e) determinación del patrón de glicosilación de dicha inmunoglobulina a partir de los datos de la espectrometría de masas obtenidos en la etapa d).
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa de separación consiste en:
- desalar mediante una cromatografía de exclusión de tamaños los fragmentos obtenidos de dicha inmunoglobulina.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha división se lleva a cabo en un intervalo de pH comprendido entre 5,5 y 8,5.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la división se lleva a cabo durante dos horas.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la relación molar de IdeS a molécula de inmunoglobulina está comprendida entre 1:25 y 1:2500.

Fig. 1

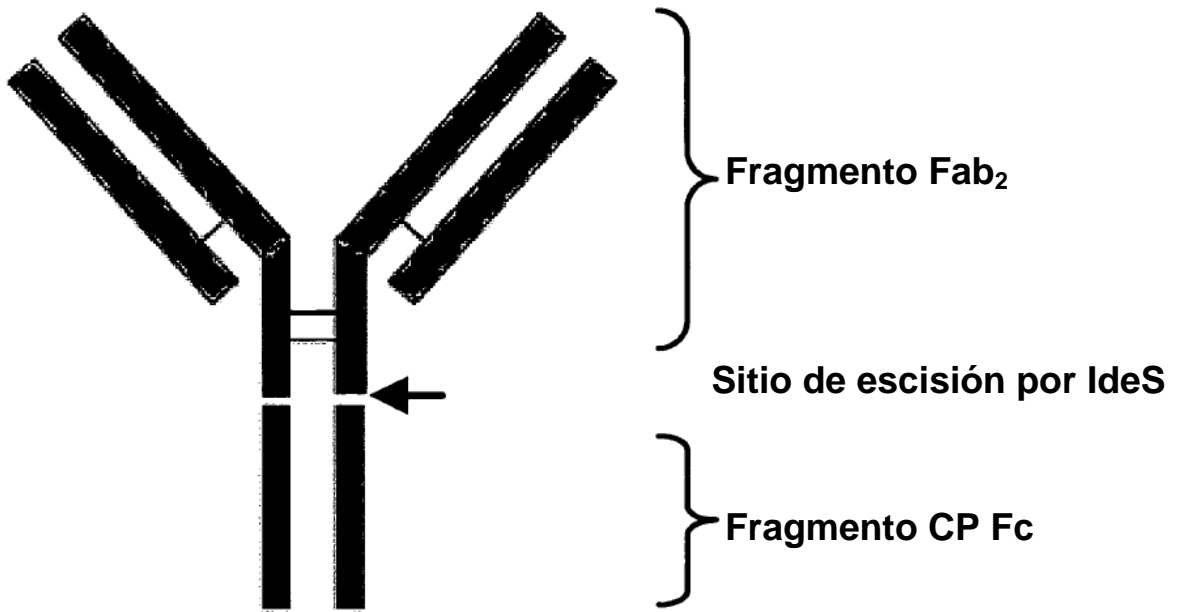


Fig. 2

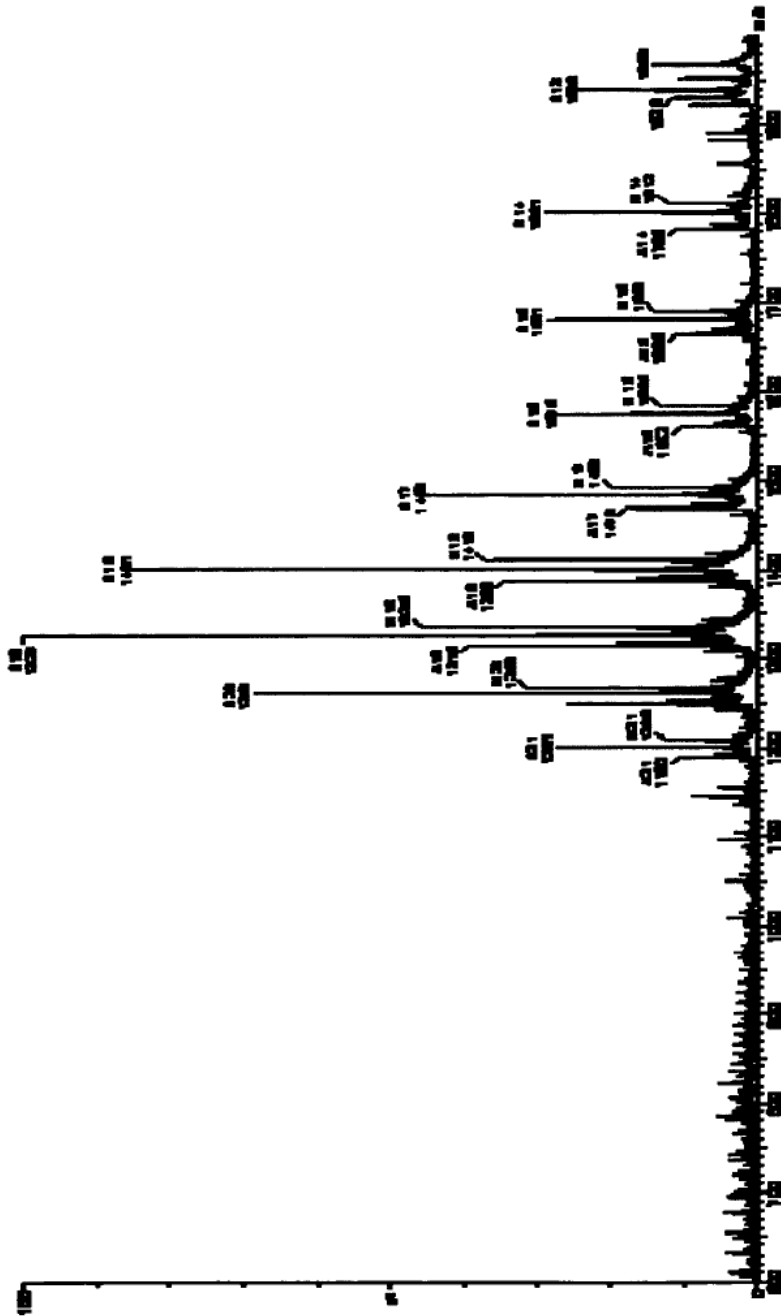


Fig. 3

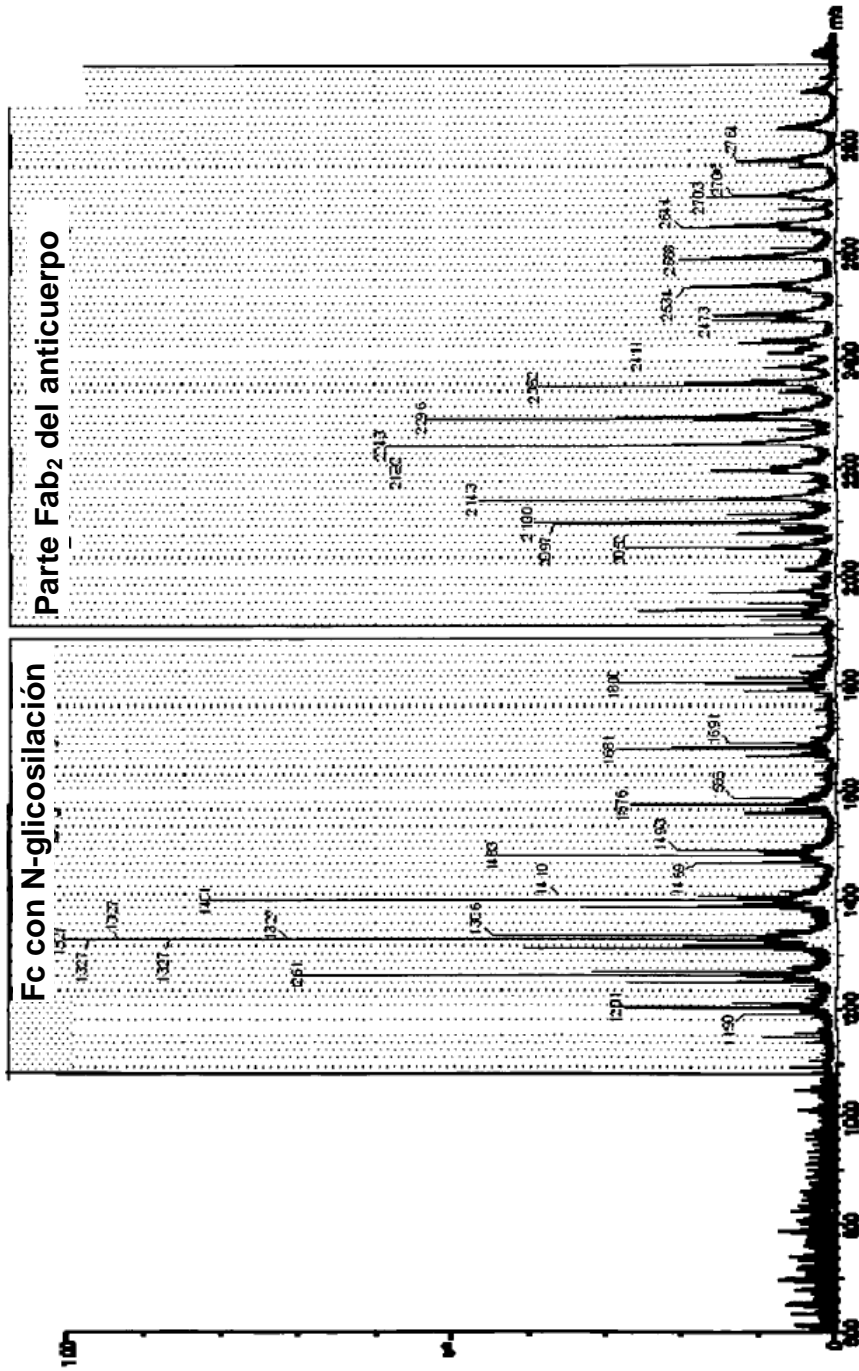


Fig. 4

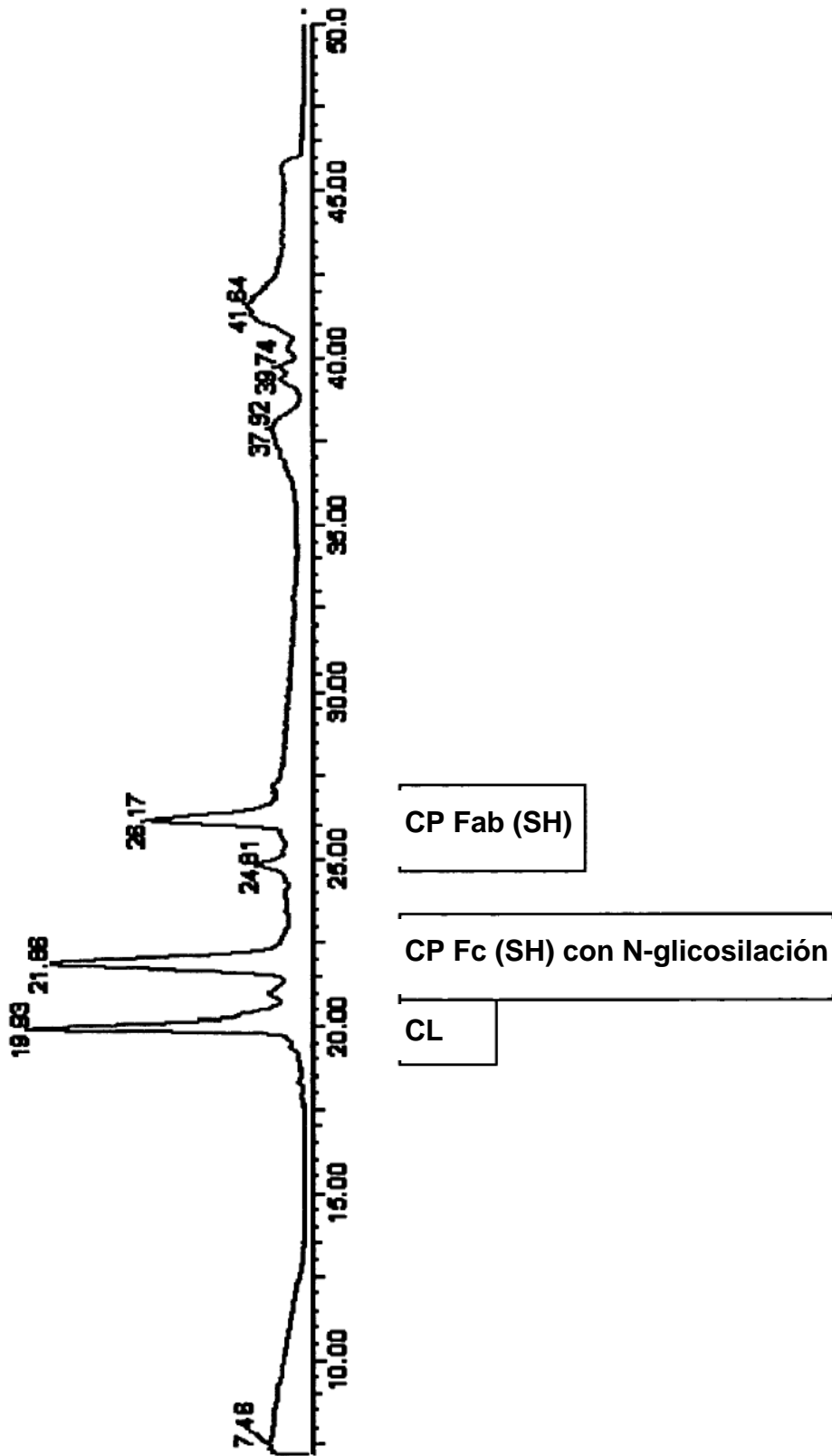


Fig. 5

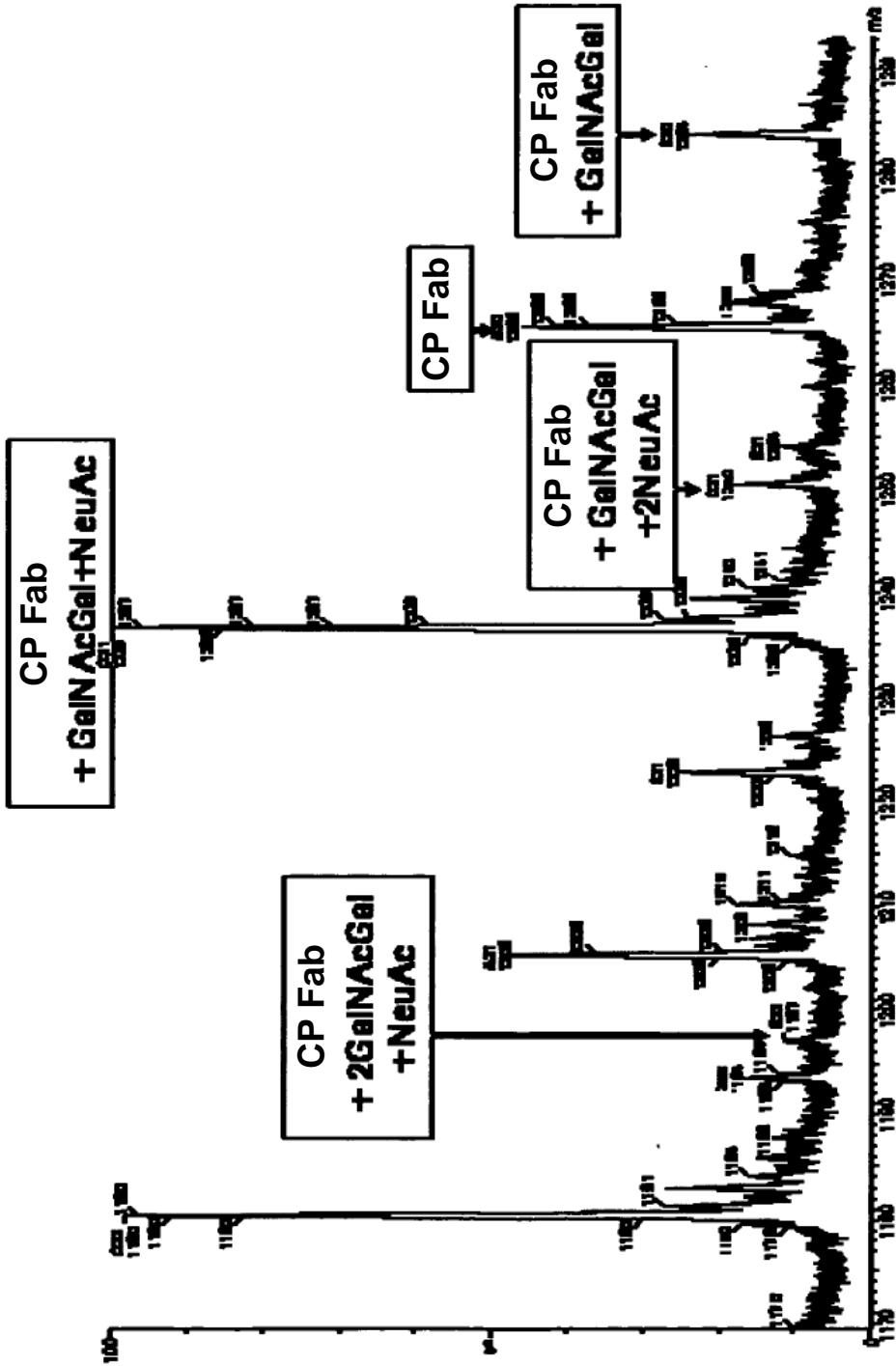


Fig. 6

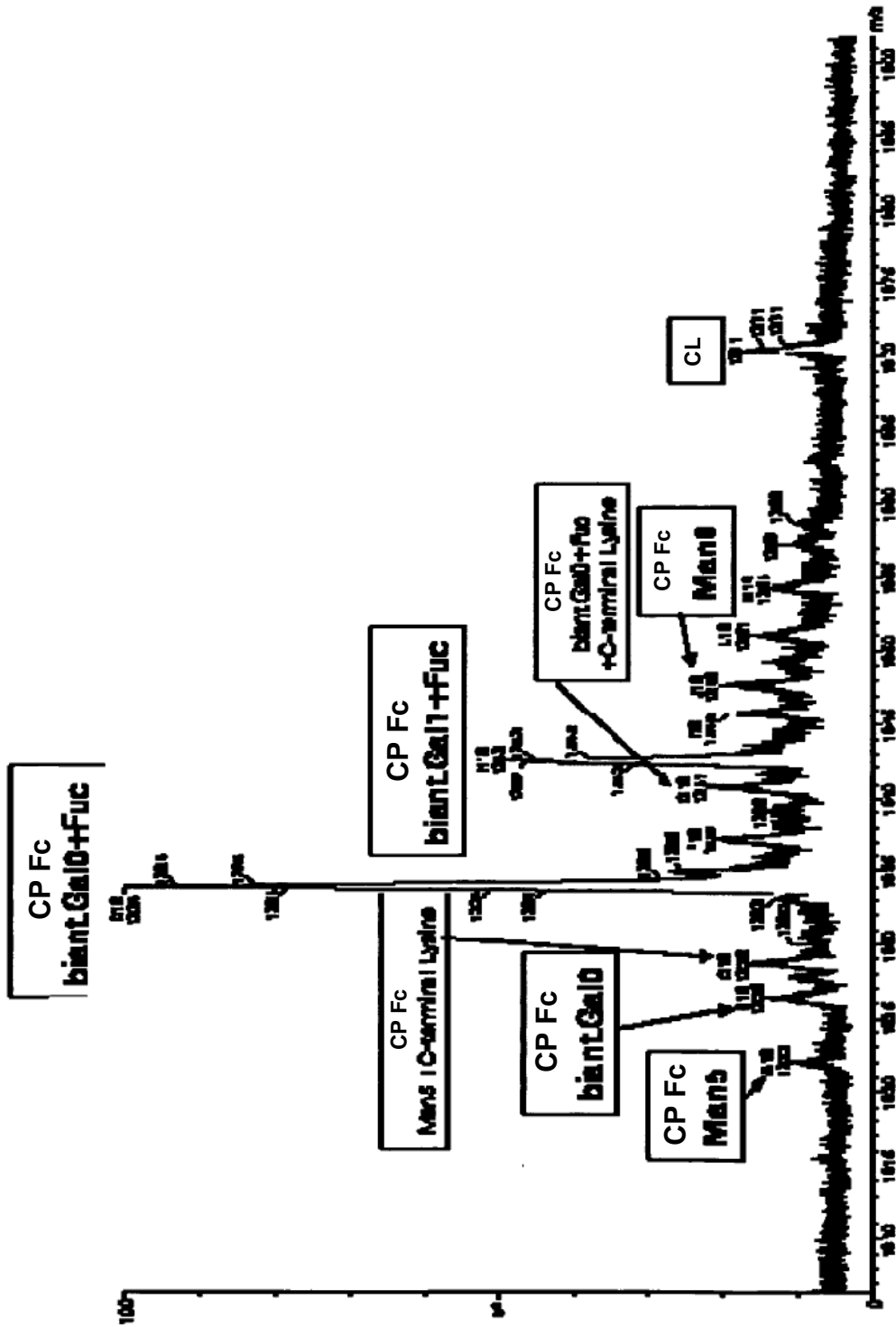


Fig. 7

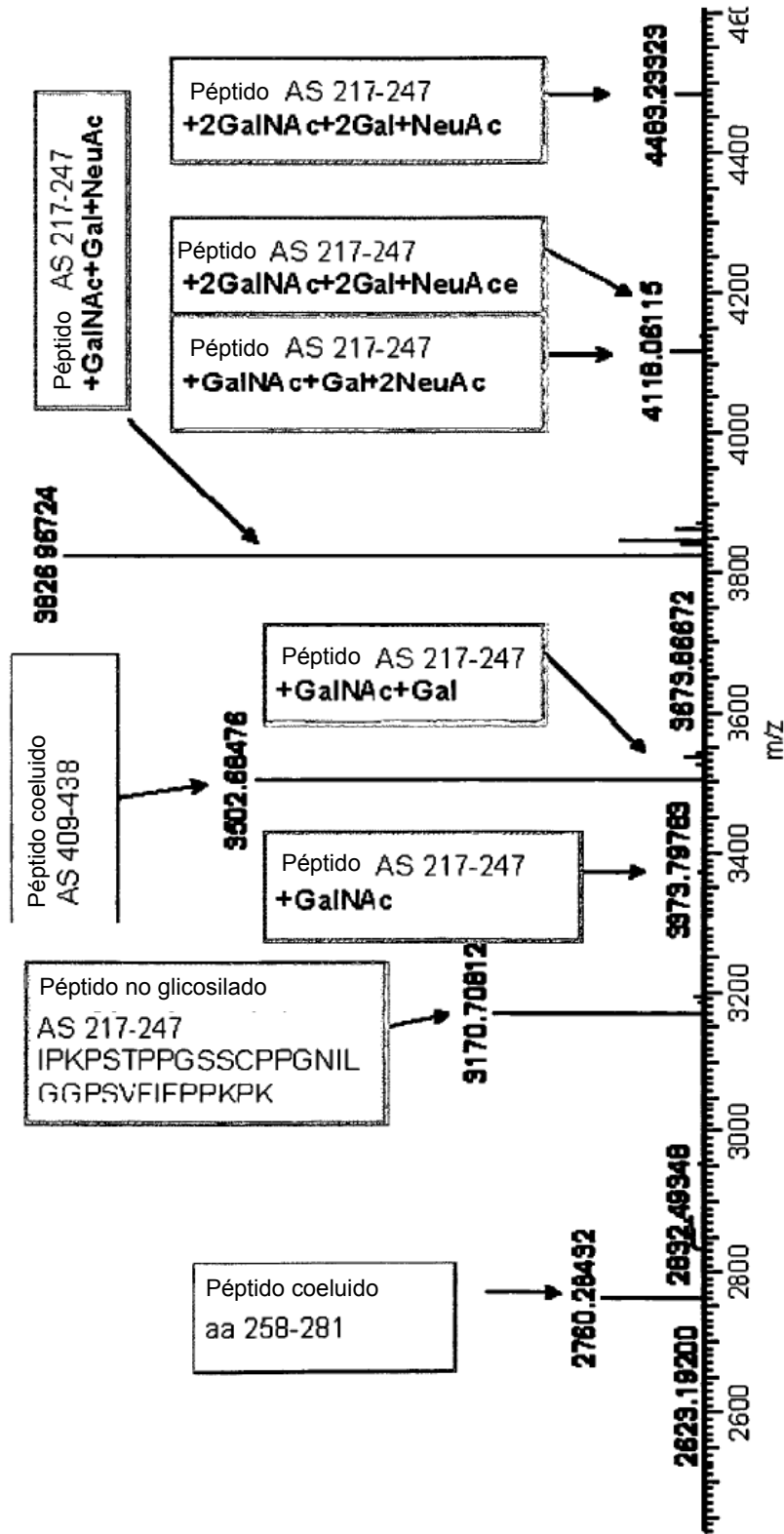


Fig. 8

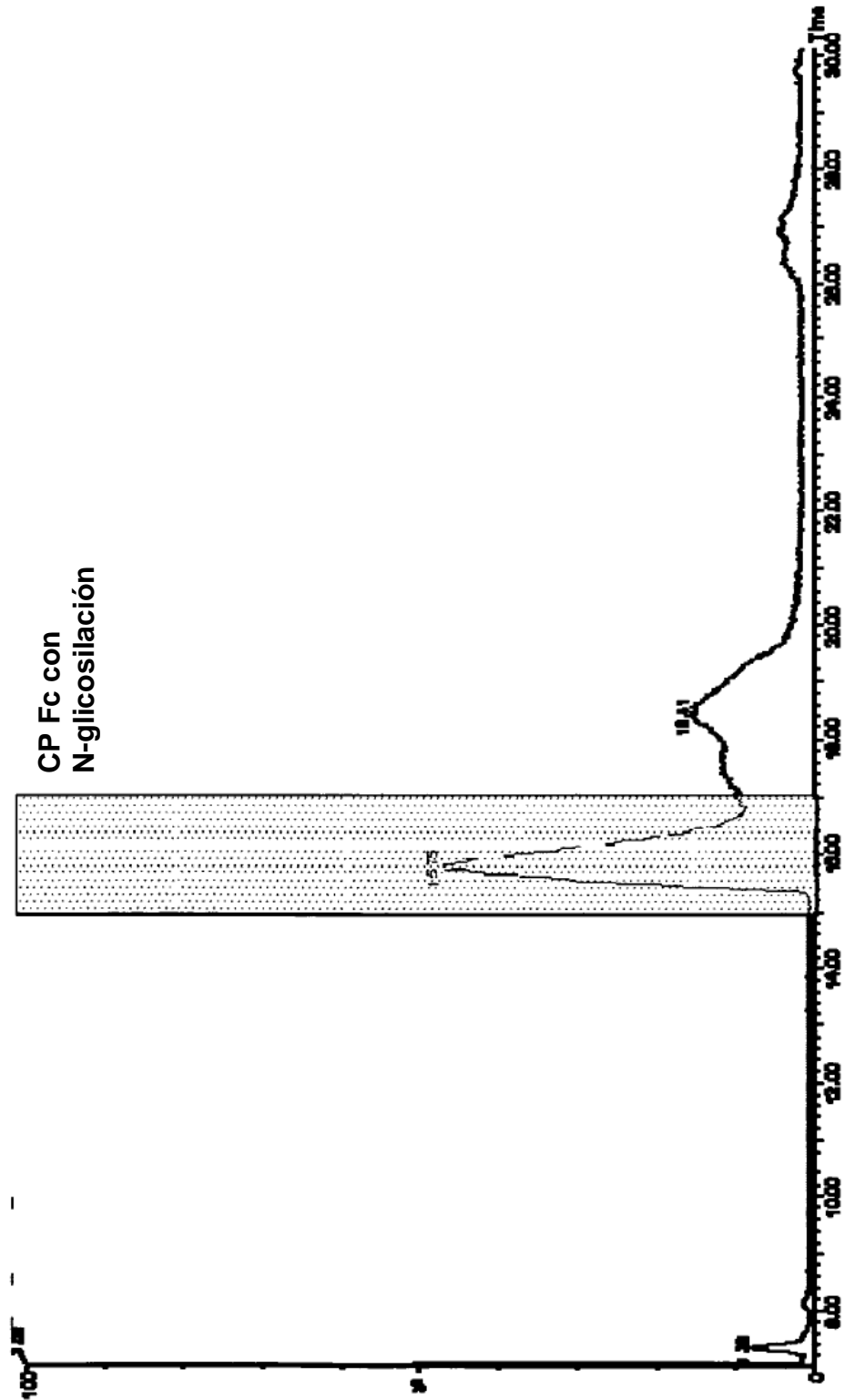


Fig. 9

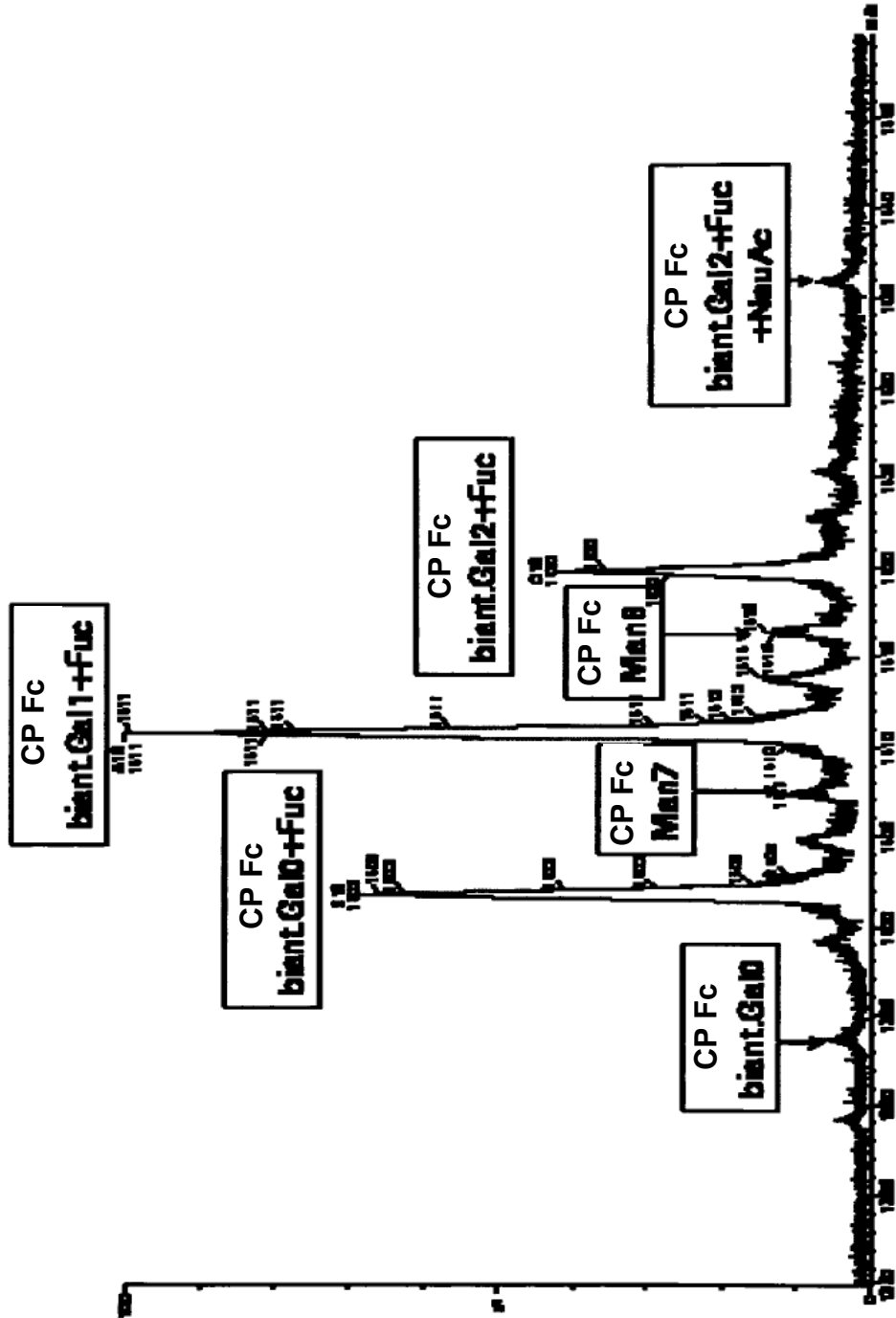


Fig. 10

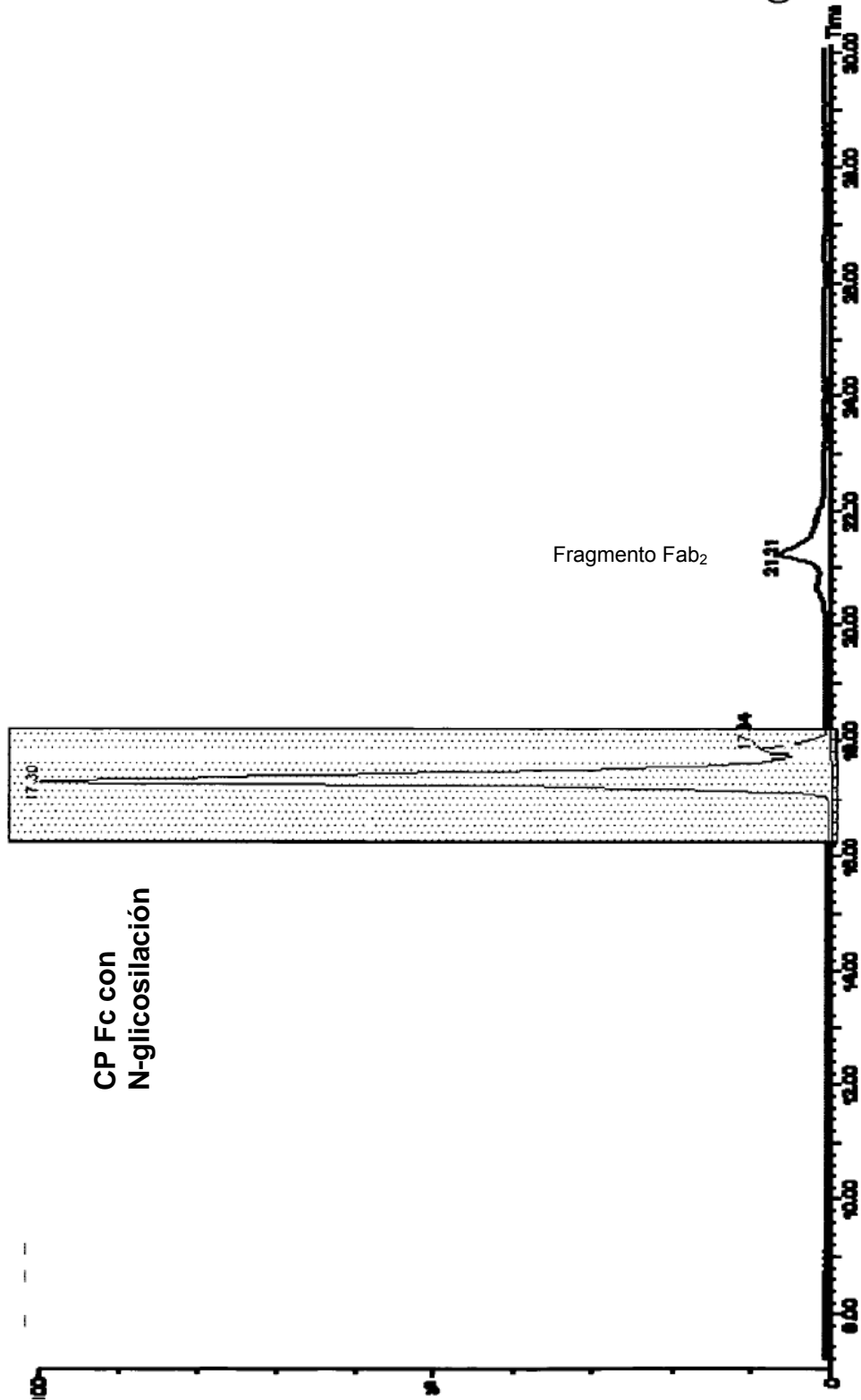
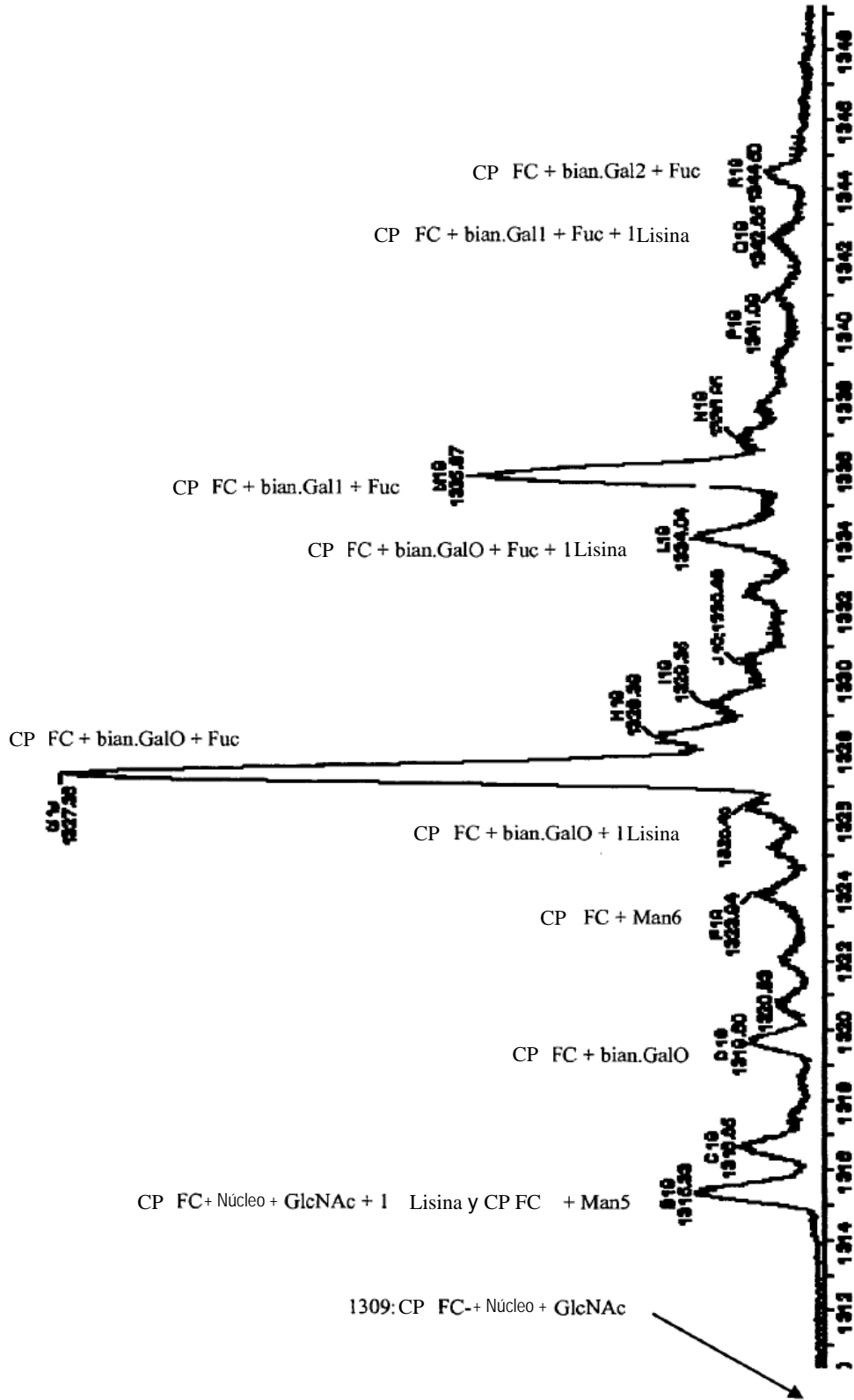


Fig. 11



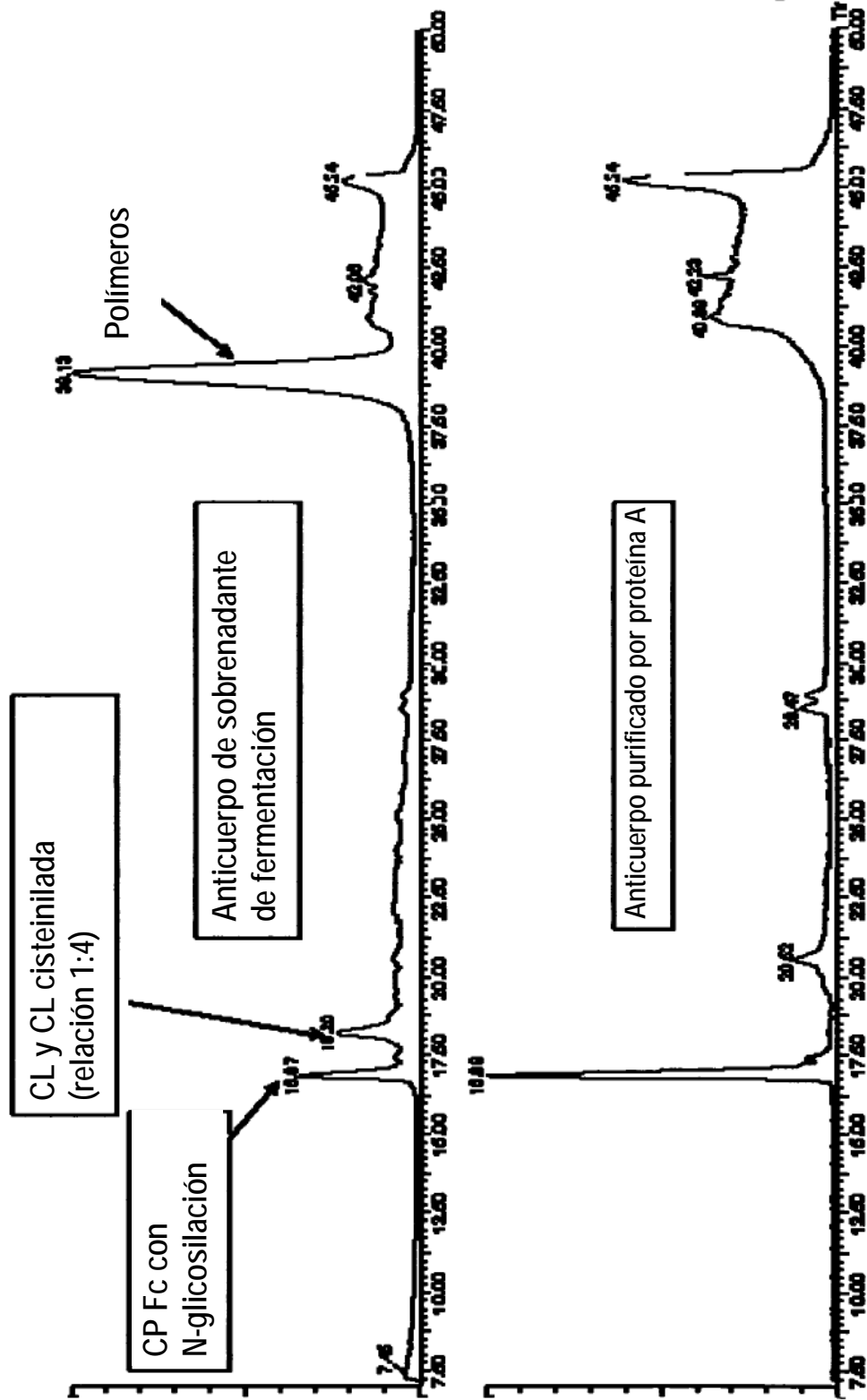


Fig. 12

Fig. 13

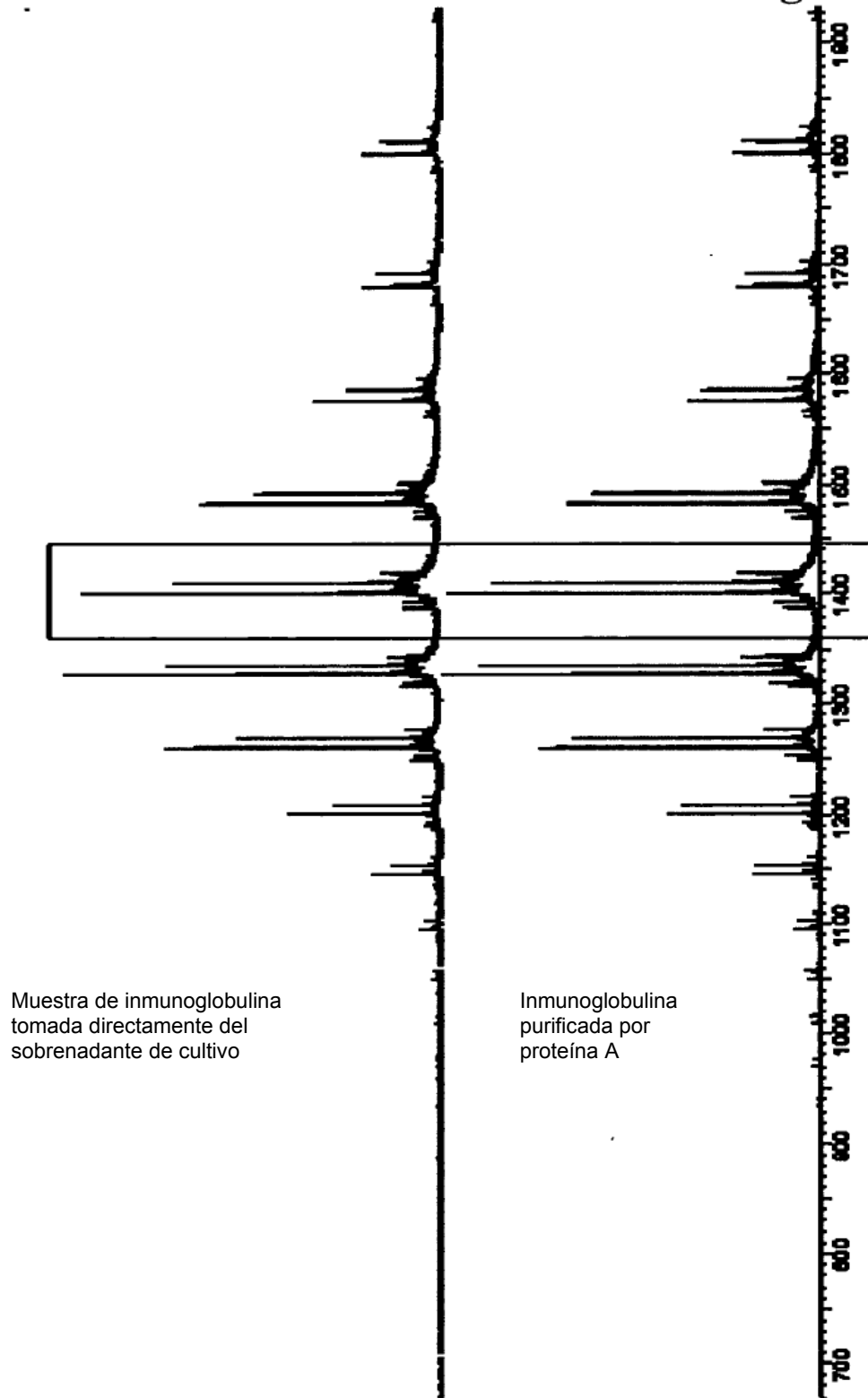


Fig. 14

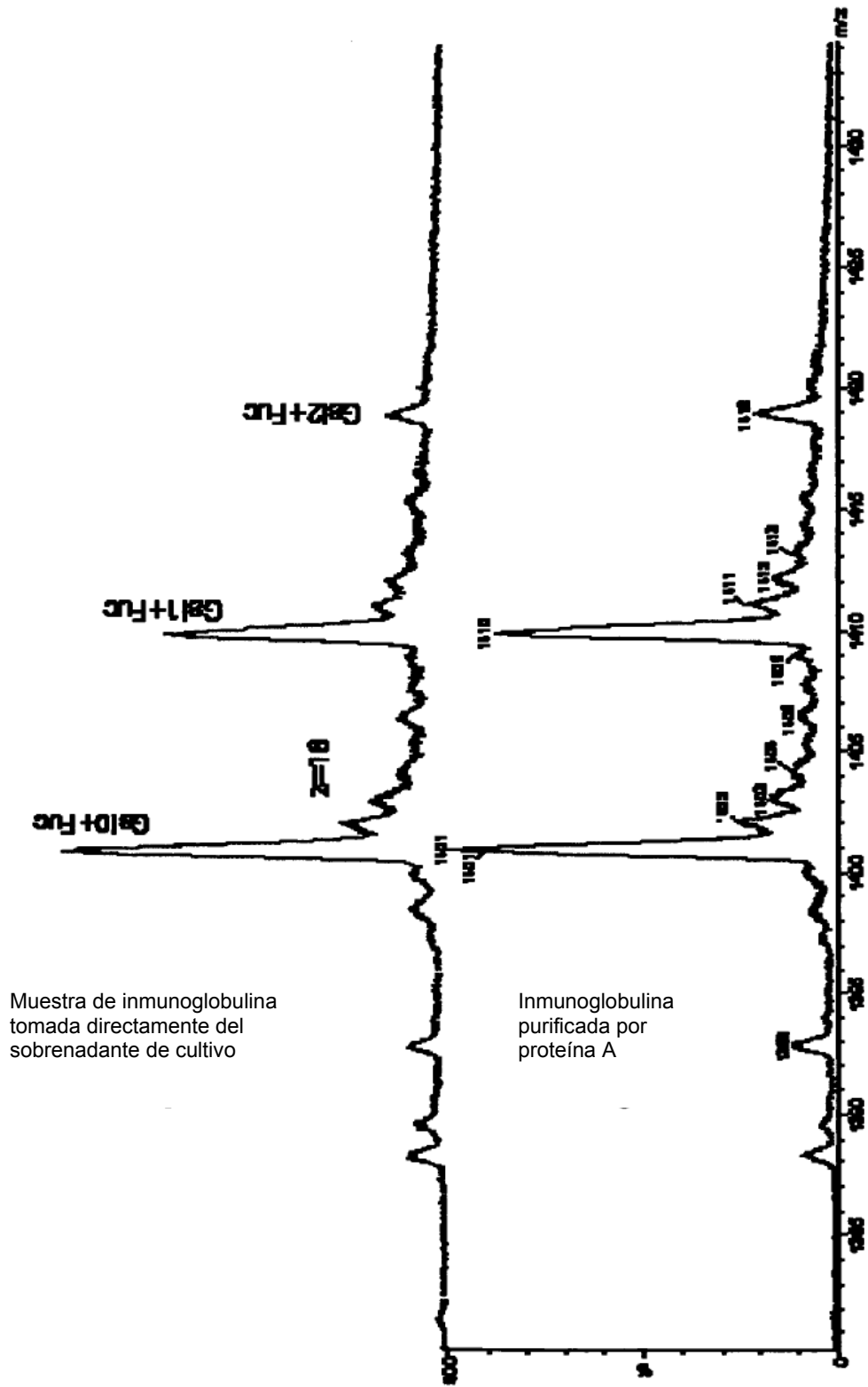


Fig. 15

