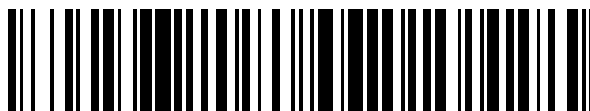


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 819**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010** **E 10742727 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2459590**

54 Título: **Procesamiento enzimático de anticuerpos**

30 Prioridad:

30.07.2009 EP 09166845

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

24.06.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HABERGER, MARKUS;
JUNG, CHRISTINE y
REUSCH, DIETMAR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 538 819 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

Procesamiento enzimático de anticuerpos

- 5 La presente invención se refiere a un método para el procesamiento enzimático posterior de inmunoglobulinas producidos recombinantemente. En mayor detalle, la presente invención se refiere a un método para la modificación del contenido de galactosa unido mediante enlace (α 1,3)glucosídico de las inmunoglobulinas de longitud completa o partes Fc de inmunoglobulina tras una cromatografía de afinidad mediante un tratamiento enzimático.
- 10 Antecedentes de la invención
- Los polipéptidos obtenidos de células eucarióticas se producen en forma de polipéptidos glucosilados. Las glucoestructuras se unen al esqueleto de aminoácidos en forma de modificación enzimática post-traducciona.
- 15 Las glucosiltransferasas se reconocen como una familia funcional de aproximadamente 250 a 300 enzimas intracelulares unidos a membrana diferentes que participan en la biosíntesis coordinada de las glucoestructuras de los polipéptidos, entre ellos glucoproteínas, proteoglicanos y glucolípidos. Las glucosiltransferasas se clasifican en grupos basándose en su especificidad de donación de monosacáridos de nucleótido. Por ejemplo, las galactosiltransferasas son el subgrupo de glucosiltransferasas que utilizan UDP-galactosa como el donante de
- 20 monosacáridos activado, mientras que las sialiltransferasas utilizan CMP-ácido siálico y las fucosiltransferasas utilizan GDP-fucosa (Shaper N.L. *et al.*, J. Mamm. Gland Biol. Neopl. 3:315-324, 1998).
- La modificación de alfa-galactosil-epítomos en diversas células de mamífero resulta de particular interés, ya que hasta el 1% de los anticuerpos IgG circulantes en el ser humano interactúa con dicho residuo oligosacárido. Este
- 25 anticuerpo natural, denominado "anti-Gal", se ha encontrado anteriormente que se une a Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc-R terminal en glucolípidos bioquímicamente definidos (Galili U. *et al.*, J. Exp. Med. 162:573-582, 1985; Galili U. *et al.*, J. Exp. Med. 165:693-704, 1987). La medición de la unión de la lectina IB4 de *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* marcada radioactivamente a las diversas células nucleadas sugiere que las células que se unen a anti-Gal expresan entre 10^5 y $3,5 \times 10^7$ epítomos alfa-galactosilo, la mayoría de los cuales, basándose en la especificidad anti-Gal,
- 30 aparentemente presentan la estructura Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc-R. La ausencia de estos epítomos de las células humanas resulta de la actividad reducida del enzima (α 1,3)galactosiltransferasa (Galili U. *et al.*, J. Biol. Chem. 263:17755-17762, 1988).
- La síntesis del epítomo Gal(α 1,3) en el aparato de Golgi de las células de origen murino (Cummings R.D. y Mattox S.A., J. Biol. Chem. 263:511-519, 1988; Blake D.A. y Goldstein I.J., J. Biol. Chem. 256:5387-5393, 1981; Elices M.J., Blake D.A. y Goldstein I.J., J. Biol. Chem. 261:6064-6072, 1986), origen leporino (Basu M. y Basu S., J. Biol. Chem. 248:1700-1706, 1973; Betteridge A. y Watkins W.M., Eur. J. Biochem. 132:29-35, 1983), origen porcino y origen
- 35 bovino (Blanken W.M. y Van den Eijnden D.H., J. Biol. Chem. 260:12927-12934, 1985) se ha demostrado que se encuentra catalizada por el enzima (α 1,3)galactosiltransferasa.
- 40 En los polipéptidos destinados a la aplicación en el ser humano, la presencia de residuos terminales de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)glucosídico debe minimizarse ya que esta glucoestructura inducirá una respuesta por parte del sistema inmunológico humano. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el desarrollo laborioso de líneas celulares para la producción recombinante del polipéptido terapéutico que no introducen residuos
- 45 terminales de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico en las glucoestructuras del polipéptido terapéutico. Con el método cromatográfico utilizado generalmente en el procesamiento posterior del polipéptido en bruto, no pueden eliminarse las glucoestructuras que contienen Gal(α 1,3).
- En la patente EP n° 0 255 153, se informa de un procedimiento para producir una α -galactosidasa capaz de reducir el contenido de galactosa de los galactomananos mediante la escisión de las unidades alfa-D-galactopiranosilo unidas en enlace 1,6 a una cadena principal de unidades beta-D-manopiranosilo unidas en enlace 1,4. Se informa de un método para el examen clínico basado en las estructuras de oligosacáridos unidos a inmunoglobulina G en la patente EP n° 0 698 793. En la patente EP n° 1 878 747 se informa de anticuerpos glucomanipulados. Se informa del marcado selectivo de glicanos de inmunoglobulina en el documento n° WO 2007/071347. En el documento n°
- 50 WO 1997/016064 se informa de métodos y composiciones para la reducción del rechazo del xenotrasplante. En el documento n° WO 2007/024743 se informa de preparaciones de anticuerpos con glucoformas sustancialmente homogéneas y no sialiladas, tales como G0 y G2, que se preparan mediante tratamiento enzimático, la expresión bajo determinadas condiciones, la utilización de células huésped particulares y el contacto con suero.
- 55 En el documento n° WO 2008/057634 se informa de polipéptidos con propiedades antiinflamatorias incrementadas y citotóxicas reducidas y métodos relacionados. En el documento n° WO 2007/024743 se informa de preparaciones de anticuerpos resistentes a la proteólisis.
- 60

Descripción resumida de la invención

Se ha encontrado que una (α 1,3)galactosidasa de origen vegetal, por ejemplo de granos de café verde (EC 3.2.1.22), puede utilizarse para eliminar selectivamente los residuos terminales de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico del oligosacárido en el aminoácido Asn297 a un dominio CH2 de inmunoglobulina. Se ha observado que las (α 1,3)galactosidasas de origen no vegetal presentan una reactividad lateral de (β 1,4)galactosidasa y/o que eran menos reactivos o nada reactivas con oligosacáridos tri- o tetra-antenarios.

De esta manera, en la presente memoria se informa de un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes en el orden siguiente:

- proporcionar un eluido de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima que escinde los residuos terminales de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- aplicar el eluido incubado de cromatografía de afinidad a un material de cromatografía con proteína A bajo condiciones adecuadas para la unión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina al material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida.

En una realización, el enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es de origen vegetal. En una realización, el enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, se selecciona de entre α -D-galactósido galactohidrolasa (EC 3.2.1.22) o melibiasa. En otra realización, el enzima es (α 1,3)galactosidasa de granos de café verde (EC 3.2.1.22). En otra realización, el residuo monosacárido terminal de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina es un residuo galactosa unido mediante enlace (α 1,3).

En una realización, la incubación del eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, comprende las etapas siguientes:

- incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con una (α 1,3)glucosidasa,
- obtener una muestra de la mezcla de incubación,
- o bien
 - o aplicar la muestra a perlas de sefarosa recubiertas de proteína A y seguidamente lavar las perlas,
 - o recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina de las perlas de sefarosa con proteína A,
 - o ajustar las condiciones del tampón para el digerido de glucosidasa/sialidasa,
 - o incubar la inmunoglobulina o fragmentos de inmunoglobulina con una glucosidasa/sialidasa para escindir todos los N-glicanos, y
 - o extraer una alícuota del digerido antes del análisis MALDI,
- o bien
 - o aplicar la muestra a perlas magnéticas recubiertas de proteína A y seguidamente lavar las perlas,
 - o incubar las perlas con una glucosidasa y recuperar los oligosacáridos escindidos, y
 - o purificar los oligosacáridos escindidos mediante cromatografía de intercambio catiónico,
- determinar el tipo y cantidad de residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en los oligosacáridos escindidos, mediante espectrometría de masas,
- continuar la incubación hasta escindir todos los residuos monosacáridos en el extremo no reductor de la glucoestructuras, las cuales pueden ser escindidas por el enzima.

En una realización todavía adicional, el método comprende las etapas siguientes en el orden siguiente a modo de primeras etapas:

- proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- cultivar la célula bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir de la célula o del medio de cultivo,

- aplicar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a un material de cromatografía con proteína A bajo condiciones adecuadas para la unión de la inmunoglobulina al material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A.

5 En una realización, el método comprende las etapas siguientes a modo de etapa final:

- purificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido con una glucoestructura definida mediante una a tres etapas de cromatografía.

10 En una realización, el enzima, que escinde el residuo monosacárido del extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es de origen vegetal. En otra realización, el enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, se selecciona de entre α -D-galactosidasa, β -galactosidasa, manosidasa, fucosidasa o sialidasa. En una realización adicional, la célula es una célula de mamífero. En otra realización, la célula de mamífero es una célula de hámster, o célula murina, o una célula de conejo o una célula de oveja o una célula de hibridoma de las mismas. En todavía una realización adicional, la célula es una célula CHO, una célula NS0, una célula BHK o una célula SP2/0.

20 Un aspecto adicional informado en la presente memoria es la utilización de una (α ,3)galactosidasa de granos de café verde (EC 3.2.1.22) para escindir los residuos terminales unidos mediante enlace (α ,3)-glucosídico de las glucoestructuras en el dominio CH2 de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido recombinantemente.

Descripción detallada de la invención

25 En la presente memoria se informa de que, por ejemplo, las (α 1,3)galactosidasas de granos de café verde (EC 3.2.1.22), puede utilizarse para eliminar selectivamente los residuos terminales de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico del oligosacárido en el aminoácido Asn297 a un dominio CH2 de inmunoglobulina. Se ha encontrado que las (α 1,3)galactosidasas de origen no vegetal presentan una reactividad lateral de (β 1,4)galactosidasa y/o que eran menos reactivos o nada reactivas con oligosacáridos tri- o tetra-antenarios (ver la Tabla 1).

Tabla 1: comparación entre las (α 1,3)galactosidasas de diferentes orígenes

(α 1,3)galactosidasa de (EC 3.2.1.22)	escisión de galactosa unida mediante enlace (α 1,3)-glucosídico	escisión de galactosa unida mediante enlace (β 1,4)-glucosídico	escisión de oligosacáridos	
			biantenarios	tri- y tetra-antenarios
grano de café verde	sí	no	sí	sí
Xanthomonas manihotis	sí	sí	sí	sí
Escherichia coli	sí	sí	sí	no

35 De esta manera, en una realización, el enzima en los métodos informados en la presente memoria, que escinde los residuos monosacáridos terminales de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es de origen vegetal. En otra realización, el enzima en los métodos informados en la presente memoria, que escinde los residuos monosacárido terminales de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es un enzima que (i) escinde los residuos sacáridos unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico, e (ii) no escinde los residuos sacáridos unidos mediante enlace (α 1,4)-glucosídico, e (iii) escinde los residuos de oligosacáridos bi-, tri- y tetra-antenarios.

En la presente memoria se informa de un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes:

- 45 - proporcionar un eluido de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con la (α 1,3)-galactosidasa de granos de café verde (EC 3.2.1.22),
- aplicar el eluido incubado de cromatografía de afinidad a un material de cromatografía con proteína A, opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la unión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina al material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida.

55 Las inmunoglobulinas humanas se encuentran glucosiladas principalmente en el residuo asparagina en la posición 297 (Asn297) del dominio CH2 de cadena pesada con un oligosacárido complejo biantenarico fucosilado nuclear (numeración de residuos aminoácidos de inmunoglobulina según Kabat, ver posteriormente). La glucoestructura

biantenaria puede estar terminada en hasta dos residuos consecutivos de galactosa (Gal) en cada brazo. Los brazos se denominan (1,6) y (1,3) según el glucósido unido al residuo central de manosa. La glucoestructura denominada G0 no comprende ningún residuo de galactosa. La glucoestructura denominada G1 contiene uno o más residuos de galactosa en un brazo. La glucoestructura denominada G2 contiene uno o más residuos de galactosa en cada brazo (Raju T.S., *Bioprocess Int.* 1:44-53, 2003). Se informa en detalle de regiones constantes de cadena pesada humana en Kabat E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y en Brüggermann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, 1987; Love, T.W. *et al.*, *Methods Enzymol.* 178:515-527, 1989. La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc de inmunoglobulina se describe en, por ejemplo, Routier F.H., *Glycoconjugate J.* 14:201-207, 1997.

El término "inmunoglobulina" se refiere a y comprende las diversas formas de inmunoglobulina, tales como las inmunoglobulinas humanas, las inmunoglobulinas humanizadas, las inmunoglobulinas quiméricas o las inmunológicas empobrecidas en antígeno de células T (ver, por ejemplo, los documentos nº WO 98/33523, nº WO 98/52976 y nº WO 00/34317). En una realización, el anticuerpo en los métodos informados en la presente memoria es un anticuerpo humano o humanizado. La ingeniería genética de inmunoglobulinas se describe en, por ejemplo, Morrison S.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855, 1984, patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244; Riechmann L. *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, *Nature* 314:268-270, 1985; Lonberg N., *Nat. Biotechnol.* 23:1117-1125, 2005.

Una inmunoglobulina en general comprende dos denominados polipéptidos de cadena ligera de longitud completa (cadena ligera) y dos denominados polipéptidos de cadena pesada de longitud completa (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de longitud completa contiene un dominio variable (región variable) (generalmente la porción aminoterminal de la cadena del polipéptido de longitud completa) que comprende regiones de unión que interactúan con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de longitud completa comprende una región constante (generalmente la parte carboxilo-terminal). La región constante de la cadena pesada de longitud completa media en la unión de la inmunoglobulina i) a células que portan un receptor de Fc gamma (FcγR), tales como células fagocíticas, o ii) a células que portan el receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor de Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo factores del sistema clásico del complemento, tal como el componente (C1q). El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de longitud completa comprende a su vez segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR). La expresión "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" se refiere a un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de inmunoglobulina y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina y opcionalmente un dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de inmunoglobulina en el caso de una inmunoglobulina de la subclase IgE. Una "cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina. Las cadenas de inmunoglobulina de longitud completa se encuentran unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa.

La expresión "fragmento de inmunoglobulina" se refiere en la presente solicitud a un polipéptido que comprende por lo menos el dominio CH2 y el dominio CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa. Un fragmento de inmunoglobulina puede comprender además secuencias de aminoácidos no derivadas de inmunoglobulina adicionales.

Se ha informado en los últimos años de que el patrón de glucosilación de las inmunoglobulinas, es decir, la composición de sacáridos y multitud de glucoestructuras unidas, presenta una fuerte influencia sobre las propiedades biológicas (ver, por ejemplo, Jefferis R., *Biotechnol. Prog.* 21:11-16, 2005). Las inmunoglobulinas producidas por células de mamífero contienen entre 2% y 3% en masa de oligosacáridos (Taniguchi T. *et al.*, *Biochem.* 24:5551-5557, 1985). Lo anterior es equivalente, por ejemplo, en una inmunoglobulina de clase G (IgG) a 2,3 residuos oligosacáridos en una IgG de origen de ratón (Mizuochi T., *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 257:387-394, 1987) y a 2,8 residuos oligosacáridos en una IgG de origen humano (Parekh R.B. *et al.*, *Nature* 316:452-457, 1985), en los que generalmente dos se encuentran situados en la región Fc en Asn²⁹⁷ y el resto en la región variable (Saba J.A. *et al.*, *Anal. Biochem.* 305:16-31, 2002).

El término "glucoestructura" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere y comprende todos los oligosacáridos que se encuentran unidos a un residuo aminoácido especificado en una inmunoglobulina. Debido a la heterogeneidad de la glucosilación de una célula, una inmunoglobulina producida recombinantemente comprende no sólo un único oligosacárido unido a N u O definido en un residuo aminoácido especificado, sino una mezcla de polipéptidos (moléculas de inmunoglobulina), presentando cada una la misma secuencia de aminoácidos pero comprendiendo oligosacáridos de diferente composición en la posición aminoácida especificada. De esta manera, el

término "glucoestructura" se refiere a un grupo de oligosacáridos que se encuentran unidos en una posición aminoácida especificada de una inmunoglobulina producida recombinantemente, es decir, la heterogeneidad del oligosacárido unido. El término "oligosacárido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un sacárido polimérico que comprende dos o más unidades monosacáridas unidas covalentemente.

Para la notación de los diferentes oligosacáridos unidos a N u O en la presente invención, los residuos sacáridos individuales se listan de extremo no reductor a extremo reductor de la molécula de oligosacárido. La cadena sacárida más larga se seleccionó como cadena básica para la notación. El extremo reductor de un oligosacárido unido a N u O es el residuo monosacárido, que se encuentra directamente unido al aminoácido del esqueleto de aminoácidos de la inmunoglobulina, mientras que el extremo de un oligosacárido unido a N u O, que se encuentra situado en el extremo opuesto como extremo reductor de la cadena básica, se denomina extremo no reductor.

La expresión "cromatografía de afinidad" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un método de cromatografía que utiliza un "material de cromatografía de afinidad". En una cromatografía de afinidad, los polipéptidos se separan basándose en su actividad biológica o estructura química dependiendo de la formación de interacciones electrostáticas, enlaces hidrofóbicos y/o enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales cromatográficos del material de cromatografía. Para recuperar el polipéptido unido específicamente del material de cromatografía de afinidad, puede añadirse un ligando competidor o pueden modificarse las condiciones cromatográficas, tales como el valor del pH, la polaridad o la fuerza iónica del tampón. Los "materiales de cromatografía de afinidad" ejemplares son los materiales de cromatografía quelantes de metales, tales como Ni(II)-NTA o Cu(II)-NTA o materiales de cromatografía de afinidad de inmunoglobulinas, tales como, en una realización de los métodos informados en la presente memoria, materiales de cromatografía que comprenden proteína A o proteína G unida covalentemente a los mismos, o materiales de cromatografía de afinidad de unión a enzima, tales como materiales de cromatografía que comprenden análogos de sustrato enzimático, cofactores enzimáticos o inhibidores enzimáticos unidos covalentemente a los mismos, como grupo funcional cromatográfico, o materiales de cromatografía de unión a lectina, tales como materiales de cromatografía que comprenden polisacáridos, receptores de superficie celular, glucoproteínas o células intactas unidas covalentemente a los mismos, como grupo funcional cromatográfico.

La expresión "enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina" se refiere a un enzima que escinde selectivamente un residuo monosacárido en el extremo no reductor de una glucoestructura. Dicho enzima es de origen vegetal. En una realización, el enzima es de origen vegetal y se selecciona de entre α -galactosidasas (que escinden los residuos de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-, (α 1,4)- y/o (α 1,6)-glucosídico; β -galactosidasa (que escinde los residuos de glucosa unidos mediante enlace (β 1,4)-glucosídico); manosidasa (que escinde los residuos de manosa); fucosidasa (que escinde los residuos de fucosa) y sialidasa (que escinde los residuos de ácido siálico). Son α -galactosidasas ejemplares, (α 1,3)-galactosidasas tales como EC 3.2.1.22 o EC 2.4.1.151 (ver, por ejemplo, Dabkowski P.L. *et al.*, Transplant Proc. 25:2921, 1993, y Yamamoto F. *et al.*, Nature 345:229-233, 1990). En una realización, el enzima es (α 1,3)galactosidasa de granos de café verde (EC 3.2.1.22).

La expresión "glucoestructura definida" se refiere en la presente solicitud a una glucoestructura en la que el residuo monosacárido en cada uno de los extremos no reductores de la glucoestructura es de un tipo específico y se encuentra unido mediante un enlace glucosídico específico al resto de la glucoestructura, es decir, todos los residuos monosacáridos adicionales han sido escindidos. La expresión "glucoestructura definida" se refiere en la presente solicitud a una glucoestructura en la que todos los residuos monosacáridos en el extremo no reductor de las glucoestructuras de un tipo específico y unidas mediante un enlace glucosídico específico a la glucoestructura han sido escindidos, es decir, las glucoestructuras de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina han sido empobrecidas en o no presentan un residuo monosacárido terminal específico unido mediante un enlace glucosídico específico al resto de la glucoestructura. Por ejemplo, en el caso de que, en una realización, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina se incubaba con una (α 1,3)galactosidasa, todas las glucoestructuras de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina no presentan ningún residuo de monosacárido galactosa unido mediante enlace (α 1,3)-glucosídico en el extremo no reductor, es decir, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina presenta una glucoestructura definida que no presenta residuos de galactosa terminales unidas mediante enlace (α 1,3)-glucosídico.

La expresión "aplicable a" y equivalentes gramaticales de la misma tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una etapa parcial de un método de purificación en el que una solución que contiene una sustancia de interés se pone en contacto con una fase estacionaria. La solución que contiene la sustancia de interés que debe purificarse pasa a través de la fase estacionaria, proporcionando una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Según las condiciones, tales como, por ejemplo, el pH, la conductividad, la concentración de sales, la temperatura y/o el caudal, algunas sustancias de la solución se unen a la fase estacionaria y de esta manera son eliminadas de la solución. Otras sustancias permanecen en solución. Las sustancias que permanecen en solución pueden encontrarse en el eluido. El "eluido" se refiere a la solución obtenida tras el paso por el

dispositivo cromatográfico, que puede ser la solución aplicada que contiene la sustancia de interés o el tampón, que se utiliza para enjuagar la columna o para provocar la elución de una o más sustancias unidas a la fase estacionaria. La sustancia de interés puede recuperarse de la solución tras la etapa de purificación mediante métodos que resultarán familiares para el experto en la materia, tales como, por ejemplo, la precipitación, la precipitación con sales, la ultrafiltración, la diafiltración, la liofilización, la cromatografía de afinidad o la reducción del volumen de solvente con el fin de obtener la sustancia en forma sustancialmente homogénea.

Una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina cuya glucoestructura puede modificarse en los métodos informados en la presente memoria puede producirse por medios recombinantes. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células eucarióticas con el posterior aislamiento de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina y la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, se utiliza una célula de hibridoma o una célula eucariótica, en la que se han introducido uno o más ácidos nucleicos codificantes de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina. En una realización, las células eucarióticas se seleccionan de entre las células CHO, las células NS0, las células SP2/0, las células HEK 293, las células COS, las células PER.C6, las células BHK, las células de conejo o las células de oveja. En otra realización, la célula eucariótica se selecciona de entre las células CHO, las células HEK o las células de conejo. Tras la expresión, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina se recupera de las células (del sobrenadante o de las células tras la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de inmunoglobulinas son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-160, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48:870-880, 1998.

La purificación de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina puede llevarse a cabo con el fin de eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas de la técnica (ver Ausubel, F. *et al.* (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar), así como combinaciones de los mismos, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas, la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio aniónico (ver, por ejemplo, Vijayalakshmi M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75:93-102, 1998).

La glucoestructura de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido recombinantemente se determinará a partir de la línea celular utilizada y las condiciones de cultivo utilizadas. Con las técnicas de procesamiento posterior convencionales, no resulta posible la eliminación selectiva de glucoestructuras específicas.

Con los métodos informados en la presente memoria, puede obtenerse una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida en procesamiento posterior. Se ha encontrado que para la eliminación de residuos de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico al extremo no reductor de las glucoestructuras de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, sólo resulta adecuada una (α 1,3)-galactosidasa de origen vegetal, especialmente procedente de los granos del café verde.

La eliminación de los residuos de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico durante el procesamiento posterior de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producida recombinantemente con un método informado en la presente memoria

- proporciona un método para la reducción de la inmunogenicidad de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido recombinantemente,
- anula la necesidad de obtener/seleccionar/utilizar una línea celular que no produce glucoestructuras con un residuo de galactosa terminal unido mediante enlace (α 1,3)-glucosídico,
- no modificada la calidad del producto debido a la etapa adicional de incubación de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina en comparación con un método sin la incubación adicional,
- proporciona un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida durante el procesamiento posterior, es decir, tras finalizar la expresión *in vitro*,

- proporciona a la inmunoglobulina una glucoestructura definida con un rendimiento mejorado ya que no se elimina ninguna inmunoglobulina con glucoestructura no deseada sino que todas las inmunoglobulinas se convierten enzimáticamente en una glucoestructura definida.

De esta manera, un aspecto informado en la presente memoria es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende la etapa siguiente:

- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con un enzima, que escinde específicamente un residuo terminal de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina.

En una realización, el enzima, que escinde específicamente un residuo terminal de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es la (α 1,3)-galactosidasa origina de los granos del café verde. En otra realización, el monosacárido terminal es galactosa unida mediante enlace (α 1,3)-glucosídico.

De esta manera, un aspecto informado en la presente memoria es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes: - proporcionar un eluido de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,

- incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima que escinde específicamente los residuos terminales de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,

- aplicar el eluido de columna de cromatografía de afinidad modificado enzimáticamente a un material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glucoestructura definida.

Para realizar un seguimiento del progreso de la reacción enzimática, puede llevarse a cabo una determinación en línea del perfil de glucosilación de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina. Por lo tanto, un aspecto informado en la presente memoria es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar un eluido de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- modificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina contenida en el eluido de la columna de cromatografía de afinidad mediante:

a) incubación del eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima que escinde específicamente los residuos terminales de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,

b) obtención de una muestra de la mezcla de incubación,

c) aplicación de la muestra a perlas magnéticas recubiertas de proteína A y seguidamente lavado de las perlas,

d) incubación de las perlas con una glucosidasa y recuperación de los oligosacáridos escindidos,

e) purificación de los oligosacáridos escindidos con una cromatografía de intercambio catiónico, f) determinación del tipo y cantidad de residuos monosacáridos en el extremo no reductor de los oligosacáridos escindidos mediante espectrometría de masas, por ejemplo mediante EM MALDI-TOF, g) repetición de las etapas a) a f) hasta que la totalidad de los residuos monosacáridos en el extremo no reductor de la glucoestructura de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina que pueden ser escindidos por el enzima han sido escindidos,

- aplicar el eluido de columna de cromatografía de afinidad enzimáticamente modificado a un material de cromatografía con proteína A, opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la unión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina contenido a dicho material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida.

Se ha encontrado que el enzima (α 1,3)-galactosidasa procedente de granos de café verde resulta inesperadamente útil en los métodos informados en la presente memoria. Las (α 1,3)-galactosidasas de un origen bacteriano se evaluaron en los métodos informados en la presente memoria pero se encontró que no resultaban adecuados.

Aunque la totalidad de dichos enzimas pueden cortar un enlace (α 1,3)-glucosídico en los oligosacáridos; únicamente la (α 1,3)-galactosidasa de granos de café verde corta dicho enlace en las glucoestructuras de las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina bajo condiciones adecuadas, con una especificidad adecuada, y con una especificidad de sustrato adecuada.

Un aspecto adicional informado en la presente memoria es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes:

- 5 - proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, - cultivar la célula bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, - recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir de la célula o del medio de cultivo, - aplicar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina recuperado a un material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A
- 10 mediante la elución de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A, - modificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina contenida en el eluido de la columna de cromatografía de afinidad mediante:
 - 15 a) incubación del eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima que escinde específicamente los residuos terminales de monosacárido de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
 - b) obtención de una muestra de la mezcla de incubación,
 - 20 c) aplicación de la muestra a perlas magnéticas recubiertas de proteína A y seguidamente lavado de las perlas,
 - d) incubación de las perlas con una glucosidasa y recuperación de los oligosacáridos escindidos,
 - e) purificación de los oligosacáridos escindidos mediante cromatografía de intercambio catiónico,
 - f) determinación del tipo y cantidad de residuos monosacáridos en el extremo no reductor de los oligosacáridos escindidos, mediante espectrometría de masas, por ejemplo mediante EM MALDI-TOF,
 - 25 g) repetición de las etapas a) a f) hasta que todos los residuos monosacáridos en el extremo no reductor de la glucoestructura de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina que pueden ser escindidos por el enzima han sido escindidos,
- aplicar el eluido de columna de cromatografía de afinidad modificado enzimáticamente a un material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glucoestructura definida.
- 30 - opcionalmente purificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido con una glucoestructura definida mediante una a tres etapas adicionales de cromatografía.
- 35 Para la purificación de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, las cuales han sido producidas mediante, por ejemplo, métodos de cultivo celular, generalmente puede utilizarse una combinación de diferentes etapas cromatográficas. Normalmente tras una cromatografía de afinidad con proteína A puede llevarse a cabo una o dos etapas adicionales de separación. En una realización, las etapas adicionales de cromatografía son una etapa de cromatografía de intercambio catiónico y una de intercambio aniónico o viceversa. La etapa de purificación final es una denominada "etapa de pulido", para la eliminación de impurezas y contaminantes residuales, tales como inmunoglobulinas agregadas, PCH (proteínas de la célula huésped) residuales, ADN (ácidos nucleicos de la célula huésped), virus o endotoxinas. En una realización, la etapa de purificación final es una cromatografía de intercambio aniónico en modo elución.
- 40 Los métodos cromatográficos generales y su utilización son conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, *Chromatography*, 5a edición, parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, New York, 1992; *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Países Bajos, 1998; *Chromatography Today*, Poole, C. F. y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, 1991; *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice*, 1982; Sambrook J., *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F. M. *et al.* (editores), John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 45 En el momento de llevar a cabo la invención, en el laboratorio de los presentes inventores se disponía de una proteína de fusión que consistía de una parte de IL-15 terminal mutada o no mutada y una parte Fc C-terminal en cantidades suficientes. Dicha proteína de fusión se utilizó a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitativa del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas. De esta manera, en una realización, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina es una proteína de fusión de una parte interleuquina-15 y una
- 50 parte Fc de origen humano de SEC ID nº 1 o 2. Dicha molécula se informa en el Ejemplo 1 y en SEC ID nº 3 y 4 (con la parte Fc murina) del documento nº WO 2005/100394.
- 55
- 60

Los ejemplos, figuras y secuencias siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

5 Descripción del listado de secuencias

SEC ID nº 1 Secuencia de ácidos nucleicos de interleuquina 15 mutada humana/Fc.

SEC ID nº 2 Secuencia de aminoácidos de interleuquina 15 mutada humana/Fc.

10 Descripción de las figuras

- Figura 1 Cromatograma iónico total de la muestra de referencia de una polipéptido de fusión de IL15FC mutado-Fc (parte superior) y de la incubación con la (α 1,3)-galactosidasa de *Xanthomonas manihotis* (parte inferior). Puede observarse que dicho enzima también presenta actividad de (β 1,4)-galactosidasa.
- Figura 2 Cromatograma iónico total de la muestra de referencia de un polipéptido de fusión de IL15FC mutado-Fc (parte superior) y de la incubación con la (α 1,3)-galactosidasa de *Escherichia coli* (parte inferior). Puede observarse que la galactosa unida mediante enlace (α 1,3)-glucosídico sólo se eliminó de los oligosacáridos biantenarios y que este enzima también presenta actividad de (β 1,4)-galactosidasa.
- Figura 3 Cromatograma iónico total de la muestra de referencia de un polipéptido de fusión de IL15FC mutado-Fc (parte superior) y de la incubación con la (α 1,3)-galactosidasa procedente de granos de café verde (parte inferior). Puede observarse que la galactosa unida mediante enlace (α 1,3)-glucosídico se eliminó por completo y que este enzima también presenta actividad de (β 1,4)-galactosidasa.

Ejemplo 1

Preparación de proteína de fusión purificada de interleuquina-15/Fc

Se preparó la proteína de fusión de interleuquina-15/Fc de acuerdo con los datos y métodos informados en las solicitudes de patente internacional nº WO 1997/041232, nº WO 2005/100394 y nº WO 2005/100395.

Ejemplo 2

Escisión de residuos de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico

Digestión con α -galactosidasa

Las muestras se ajustaron a las condiciones de tampón correspondientes mediante diálisis (ver la Tabla 2) y después se incubaron con el enzima.

Por ejemplo:

se digirieron 40 ml de la solución de proteína de fusión de interleuquina-15/Fc con una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, con 1,5 ml de (α 1,3)-galactosidasa (204 U/ml) durante la noche (16 horas) a 25°C.

Tabla 2: condiciones de digestión enzimática

(α 1,3)galactosidasa de (EC 3.2.1.22)	condiciones de tampón	cantidad de proteína de fusión de interleuquina-15/Fc	Cantidad de (α 1,3)galactosidasa	Condiciones de conversión
granos de café verde	Citrato/fosfato sódico 100 mM (pH 6,0) *	100 μ g de solución de proteína	1 U	37°C, 18 horas
<i>Xanthomonas manihotis</i>	Acetato sódico 50 mM CaCl ₂ 5 mM pH 5,5	100 μ g de solución de proteína	840 U	37°C, 18 horas
<i>Escherichia coli</i>	fosfato sódico 250 mM, pH 6,5 *	100 μ g de solución de proteína	1 U	37°C, 18 horas
*según el manual del fabricante				

Purificación a escala pequeña con proteína A

La columna de proteína A se equilibró con tampón de Tris (hidroximetil)aminometano (TRIS) 25 mM que contenía cloruro sódico 25 mM y EDTA 5 mM a pH 7,2. Se aplicaron las muestras a la columna, se lavó la columna con tampón de equilibrado y se eluyó la proteína de fusión con tampón citrato 100 mM, pH 3,6.

Preparación de muestras para espectrometría de masas

Se intercambió el tampón de las muestras que contenían 100 µg de la proteína de fusión de interleuquina-15/Fc mediante centrifugas Centricon por TRIS-HCl 2 mM, pH 7,0. Se digirieron 50 µl de la proteína de fusión de interleuquina-15/Fc con 1 µl de N-glucosidasa F y 1 µl de sialidasa para cortar los glicanos de la proteína y eliminar las fracciones de ácido siálico.

La resina de intercambio iónico AG 50W-X8 se suspendió en agua y se agitó varias veces. Tras sedimentar la resina, se descartó el agua. Lo anterior se llevó a cabo tres veces. Se transfirieron 900 µl de la suspensión a una columna cromatográfica MICRO Bio-Spin y se centrifugó durante 1 minuto.

Las muestras digeridas se aplicaron a la columna y las columnas se centrifugaron durante 1 min. Se recogieron los glicanos purificados en el eluido. Las soluciones obtenidas se diluyeron 1:1 con solución de matriz sDHB (sDHB en 125 µl de etanol y 125 µl de cloruro sódico 10 mM en agua).

Alternativamente, se mezcló una alícuota de 1 µl de digerido con 1 µl de solución de matriz DHB (10 mg de DHB en cloruro sódico 10 mM en agua) y se secó rápidamente bajo alto vacío, obteniendo puntos homogéneos para el análisis de MALDI-TOF.

Espectrometría de masas

Se adquirieron los espectros de calibración con un espectrómetro de masas de MALDI-TOF Voyager DE Pro de Applied Biosystems en el modo Reflectron. Se fijó el voltaje de aceleración en 20.000 V; el voltaje de red era de 76% y relación de voltaje de espejo: 1,12. El tiempo de retardo de extracción se fijó en 110 ns. El intervalo de adquisición de masas era de entre 1.000 y 5.000 Da; la intensidad del láser era de 2.460 y la tasa de rep. del láser, de 20,0 Hz.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Procesamiento enzimático de anticuerpos

<130> 26225 WO

<150> EP 09166845.9

<151> 2009-07-30

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1113

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ácidos nucleicos de IL15/Fc mutado humano con péptido líder CD5

<400> 1

```

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtaac tgetggggat gctgggtcgct      60
tcctgcctcg gaaactgggt gaatgtaata agtgatttga aaaaaattga agatcttatt      120
caatctatgc atattgatgc tactttatat acggaaagtg atgttcaccc cagttgcaaa      180
gtaacagcaa tgaagtgcct tctcttggag ttacaagtta ttccacttga gtccggagat      240
gcaagtattc atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacaacag tttgtcttct      300
aatgggaatg taaçagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt      360
aaagaatttt tggacagttt tgtacatatt gtcgacatgt tcatcaacac ttcggatccc      420
aaatctgctg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      480
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      540
gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      600
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      660
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag      720
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      780
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag      840
ctgaccaaga accaggtcag cotgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      900
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg      960

ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      1020
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      1080
cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga                                     1113

```

<210> 2
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de IL15/Fc mutado humano con péptido líder CD5

<400> 2

ES 2 538 819 T3

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
20 25 30

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr
35 40 45

Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
50 55 60

Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
85 90 95

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
100 105 110

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val
115 120 125

His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Pro Lys Ser Ala Asp
130 135 140

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

ES 2 538 819 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una inmunoglobulina o polipéptido que comprende por lo menos el dominio CH2 y el dominio CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa con una glucoestructura definida, que comprende las etapas siguientes:
 - proporcionar un eluido de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
 - incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con una α -galactosidasas de origen vegetal que escinde los residuos terminales de galactosa unidos mediante enlace (α 1,3)-glucosídico en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
 - aplicar el eluido de columna de cromatografía de afinidad incubado a un material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A y producir de esta manera una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glucoestructura definida.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, es la (α 1,3)-galactosidasa (EC 3.2.1.22) procedente de granos de café verde.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la incubación del eluido de columna de cromatografía de afinidad con un enzima, que escinde el residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en el dominio CH2 de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, comprende las etapas siguientes:
 - incubar el eluido de columna de cromatografía de afinidad con una (α 1,3)-glucosidasa,
 - obtener una muestra de la mezcla de incubación,
 - o bien
 - + aplicar la muestra a perlas de sefarosa recubiertas de proteína A y seguidamente lavar las perlas,
 - recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina de las perlas de sefarosa con proteína A,
 - + ajustar las condiciones del tampón para el digerido de glucosidasa/sialidasa, y
 - + incubar la inmunoglobulina o fragmentos de inmunoglobulina con una glucosidasa/sialidasa para escindir todos los N-glicanos, o
 - + aplicar la muestra a perlas magnéticas recubiertas de proteína A y seguidamente lavar las perlas,
 - + incubar las perlas con una glucosidasa y recuperar los oligosacáridos escindidos, y
 - + purificar los oligosacáridos escindidos mediante cromatografía de intercambio catiónico,
 - determinar el tipo y cantidad de residuo monosacárido en el extremo no reductor de la glucoestructura en los oligosacáridos escindidos, mediante espectrometría de masas,
 - continuar la incubación hasta que todos los residuos monosacáridos en el extremo no reductor de la glucoestructuras que pueden ser escindidos por el enzima han sido escindidos.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además las etapas siguientes como primeras etapas:
 - proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, - cultivar la célula, - recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a partir de la célula o del medio de cultivo, - aplicar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina a un material de cromatografía con proteína A y recuperar la inmunoglobulina a partir del material de cromatografía con proteína A.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa siguiente como etapa final:
 - purificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido con una glucoestructura definida mediante una a tres etapas de cromatografía.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado por que la célula es una célula de mamífero.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que la célula de mamífero es una célula de hámster, una célula murina, una célula de conejo, una célula de oveja o una célula de hibridoma de las mismas.
8. Método según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que la célula es una célula CHO, una célula NS0, una célula BHK o una célula SP2/0.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos aminoácidos 18 a 364 de SEC ID nº 2.

- 5 10. Utilización de una (α ,3)galactosidasa procedente granos de café verde (EC 3.2.1.22) para escindir los residuos terminales de galactosa unidos mediante enlace (α ,3)-glucosídico al aminoácido asparagina del dominio CH2 de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina producido recombinantemente.

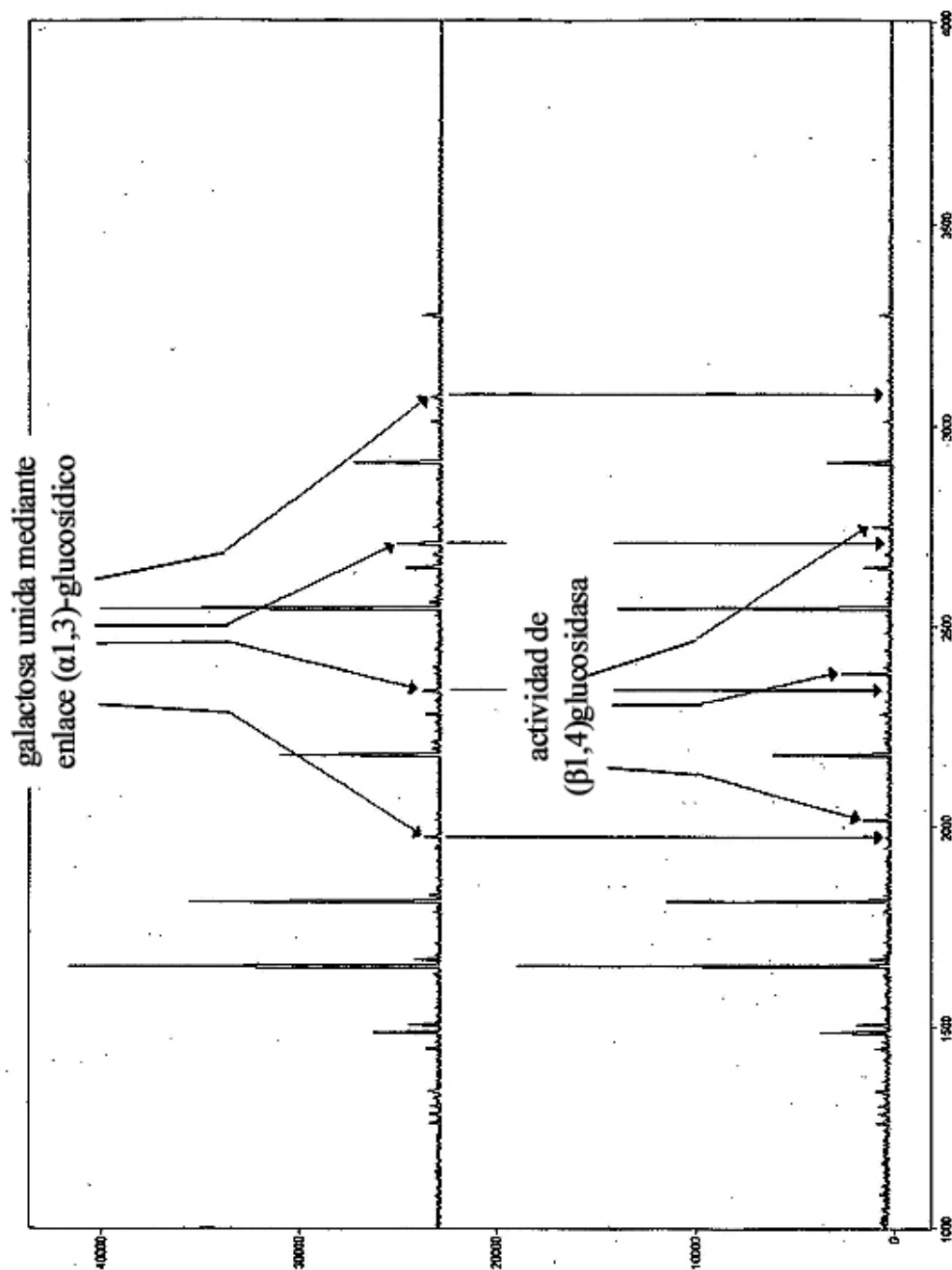
Figura 1

Figura 2

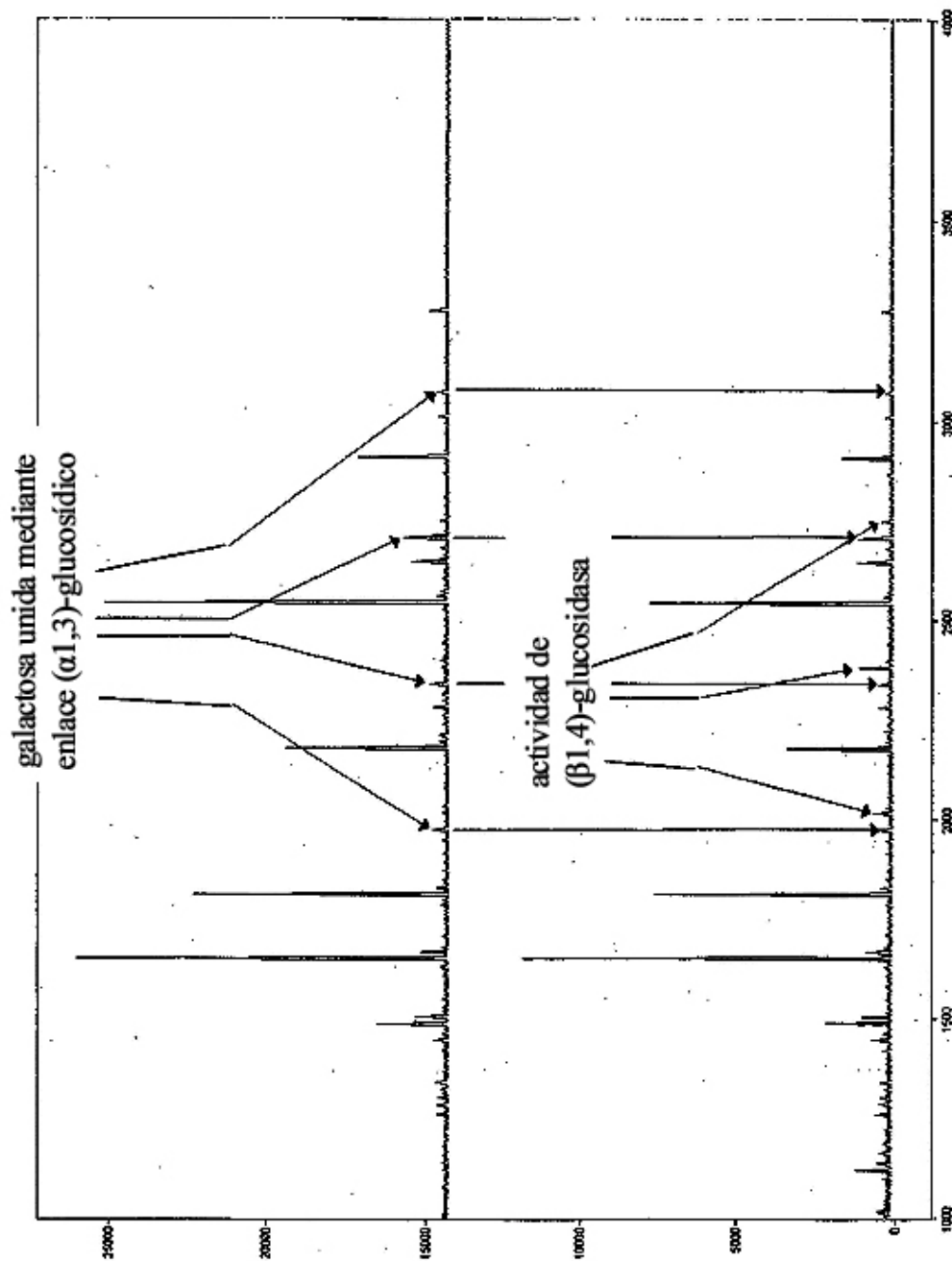


Figura 3