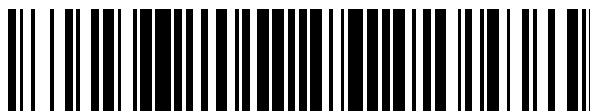


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 215**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2012 E 12769409 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2764020**

54 Título: **Proceso para la producción de anticuerpos de la glicoforma G1**

30 Prioridad:

05.10.2011 EP 11184011

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

14.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HUELLER, MARTINA y
REUSCH, DIETMAR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 215 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

Proceso para la producción de anticuerpos de la glicofoma G1

5 La presente invención se refiere a un método para el procesamiento enzimático aguas abajo de inmunoglobulinas recombinantemente producidas. En más detalle, la presente invención se refiere a un método para producir una inmunoglobulina con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura después de una etapa de cromatografía de afinidad por un tratamiento enzimático.

10 Antecedentes de la invención

Los polipéptidos obtenidos a partir de células eucariotas se producen como polipéptidos glicosilados. Las glicoesctructuras están unidas al esqueleto del aminoácido como modificación enzimática postraducciona.

15 Las glicosiltransferasas son reconocidas como una familia funcional de aproximadamente 250-300 enzimas unidas a membrana intracelulares diferentes que participan en la biosíntesis coordinada de las glicoesctructuras de polipéptidos, que incluyen glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos. Las glicosiltransferasas se clasifican en grupos basándose en su especificidad por donante de monosacárido de nucleótido. Por ejemplo, las galactosiltransferasas son el subconjunto de glicosiltransferasas que usan UDP-galactosa como donante de monosacárido activado, mientras que las sialiltransferasas usan CMP-ácido siálico y las fucosiltransferasas usan GDP-fucosa (Formar, N.L., et al., J. Mamm. Gland Biol. Neopl. 3 (1998) 315-324).

20 Un método para el examen clínico basado en las estructuras de oligosacáridos ligados a inmunoglobulina G se informa en el documento EP 0 698 793. En el documento EP 1 878 747 se informan anticuerpos glicomanipulados. El marcado selectivo de glicanos de inmunoglobulina se informa en el documento WO 2007/071347. En el documento WO 1997/016064 se informan métodos y composiciones para la reducción del rechazo de xenotrasplante. Preparaciones de anticuerpos con glicoesctructuras sustancialmente homogéneas y no sialiladas, tales como G0 y G2, que se preparan por tratamiento enzimático, expresión bajo ciertas condiciones, uso de células huésped particulares y contacto con suero, se informan en el documento WO 2007/024743.

25 En el documento WO 2008/057634 se informan polipéptidos con propiedades antiinflamatorias mejoradas y citotóxicas reducidas y métodos relacionados. Las preparaciones de anticuerpos resistentes a la proteólisis se informan en el documento WO 2007/024743.

30 Sumario de la invención

35 Se ha encontrado que con la secuencia de etapas enzimáticas que se informa en el presente documento puede obtenerse una inmunoglobulina con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura, es decir, con una pureza del 90 % o más, con una pureza del 95 % o más, o con una pureza del 98 % o más.

40 Por tanto, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura a partir de una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de inmunoglobulina glicosilada o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada que es una mezcla de glicoesctructuras G0, G1 y G2.

45 Por tanto, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura a partir de una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de inmunoglobulina glicosilada o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada que tiene una glicoesctructura G0.

50 Por tanto, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura a partir de una inmunoglobulina glicosilada o un fragmento de inmunoglobulina glicosilada o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada que tiene una glicoesctructura G2.

55 Así, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura o un fragmento de inmunoglobulina con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoesctructura G1 en forma sustancialmente pura que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 60
- proporcionar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión, que es una mezcla de una glicoesctructura G0, G1 y G2,
 - 65 incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una galactosiltransferasa,

- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una sialiltransferasa,
- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una beta-1,4-galactosidasa o lactasa,
- eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa o lactasa, e
- 5 - incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una sialidasa y así producir una inmunoglobulina con una glicoestructura G1 o un fragmento de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura.

10 Así, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura o un fragmento de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 15 - proporcionar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene una inmunoglobulina, que tiene una glicoestructura G0, o un fragmento de inmunoglobulina, que tiene una glicoestructura G0, o un polipéptido de fusión, que tiene una glicoestructura G0,
- incubar la inmunoglobulina o el fragmento de inmunoglobulina o el polipéptido de fusión con una galactosiltransferasa,
- 20 - incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o el polipéptido de fusión con una sialiltransferasa,
- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o el polipéptido de fusión con una beta-1,4-galactosidasa o lactasa,
- eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa o lactasa, e
- 25 - incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o el polipéptido de fusión con una sialidasa y así producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura.

30 Así, en el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura o un fragmento de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura o un polipéptido de fusión que comprende un fragmento de inmunoglobulina glicosilada con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 35 - proporcionar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene una inmunoglobulina, que tiene una glicoestructura G2, o un fragmento de inmunoglobulina, que tiene una glicoestructura G2, o un polipéptido de fusión, que tiene una glicoestructura G2,
- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión con una sialiltransferasa,
- incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión con una beta-1,4-galactosidasa o lactasa,
- eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa o lactasa, e
- 40 - incubar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o un polipéptido de fusión con una sialidasa y así producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura.

45 En una realización, la galactosiltransferasa se añade en una a diez alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en dos a siete alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en tres a seis alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en cuatro o seis alícuotas.

50 En una realización, la incubación con la galactosiltransferasa es durante aproximadamente 30 horas a aproximadamente 60 horas.

En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade después de cero a dos horas de incubar. En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade al principio de la incubación.

55 En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade cinco a veinte horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade seis a doce horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade ocho a diez horas después de haberse añadido la alícuota previa.

60 En una realización, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión no se purifica antes de la incubación con sialiltransferasa. En una realización, la incubación con sialiltransferasa es de la mezcla de reacción en bruto de la incubación con galactosiltransferasa.

En una realización, la eliminación es por cromatografía en columna. En una realización, la cromatografía en columna es cromatografía en columna de afinidad de proteína A.

65

En una realización, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión se purifica antes de la incubación con beta-1,4-galactosidasa.

5 En una realización, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión se purifica antes de la incubación con sialidasa.

Descripción detallada de la invención

10 En el presente documento se informa que con la secuencia de etapas enzimáticas de

- i) galactosilación,
- ii) sialidación,
- iii) desgalactosilación, y
- iv) desialidación

15 puede obtenerse una inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura, es decir, con una pureza del 90 % o más, con una pureza del 95 % o más, o con una pureza del 98 % o más.

20 Especialmente la galactosilación tiene que realizarse durante un periodo de tiempo más largo de hasta 60 horas, por lo que la enzima galactosiltransferasa se añade múltiples veces durante este periodo de tiempo.

Tabla 1: Comparación de diferentes números de alícuotas usadas para procesar un anticuerpo anti-HER2.

Número de alícuotas de galactosiltransferasa	Rendimiento de la glicofoma G2
una, 19 horas de incubación	aprox. 40 %
una, 48 horas de incubación	aprox. 60 %
dos, 21 horas de incubación	aprox. 65 %
tres, 30 horas de incubación	aprox. 75 %
cuatro, 48 horas de incubación	aprox. 90 %

25 Tabla 2: Comparación de diferentes números de alícuotas usadas para procesar un anticuerpo anti-IL-1R.

Número de alícuotas de galactosiltransferasa	Rendimiento de la glicofoma G2
dos, 21 horas de incubación	aprox. 80 %
tres, 28 horas de incubación	aprox. 95 %

30 Así, en una realización, la galactosiltransferasa se añade en una a diez alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en dos a siete alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en tres, o cuatro, o cinco, o seis alícuotas.

35 En una realización, la incubación con la galactosiltransferasa es durante aproximadamente 30 horas a aproximadamente 60 horas.

En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade después de cero a dos horas de incubación. En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade al principio de la incubación.

40 En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade cinco a veinte horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade seis a doce horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade ocho a diez horas después de haberse añadido la alícuota previa.

45 En el presente documento se informa un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- incubar el eluato de columna de cromatografía de afinidad con una galactosiltransferasa,
- 50 - incubar el producto de reacción de galactosiltransferasa con una sialiltransferasa,
- incubar el producto de reacción de sialiltransferasa con una beta-1,4-galactosidasa,
- eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa, e
- incubar el producto de reacción de beta-1,4-galactosidasa en el que la beta-1,4-galactosidasa se ha eliminado o inactivado con una sialidasa.

55

La beta-1,4-galactosidasa o su actividad, respectivamente, tiene que eliminarse/inactivarse antes de la adición de la sialidasa con el fin de obtener la glicoestructura G1. En presencia de beta-1,4-galactosidasa catalíticamente activa, el producto de reacción intermedio se transformaría en la glicoestructura G0.

- 5 En una realización, la galactosiltransferasa es una beta-1,4-galactosiltransferasa. En una realización, la galactosiltransferasa es beta-1,4-galactosiltransferasa de leche bovina.

10 Las inmunoglobulinas humanas están principalmente glicosiladas en el residuo de asparagina en aproximadamente la posición 297 (Asn297) del dominio CH2 de la cadena pesada o en la región FAB con un oligosacárido complejo biantenarico más o menos fucosilado (numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulina según Kabat, véase más adelante). La glicoestructura biantenarica puede estar terminada por hasta dos residuos de galactosa (Gal) consecutivos en cada brazo. Los brazos se denominan (1,6) y (1,3) según el enlace glucósido al residuo de manosa central. La glicoestructura denominada G0 no comprende residuo de galactosa. La glicoestructura denominada G1 contiene uno o más residuos de galactosa en un brazo. La glicoestructura denominada G2 contiene uno o más residuos de galactosa en cada brazo (Raju, T.S., *Bioprocess Int.* 1 (2003) 44-53). Regiones de la cadena pesada constantes humanas se informan en detalle por Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y por Brueggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527. La glicosilación tipo CHO de partes de Fc de inmunoglobulinas se describe, por ejemplo, por Routier, F.H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207.

20 El término "inmunoglobulina" indica y engloba las diversas formas de inmunoglobulinas tales como inmunoglobulinas humanas, inmunoglobulinas humanizadas, inmunoglobulinas quiméricas o inmunoglobulinas agotadas en antígenos de linfocitos T (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/33523, WO 98/52976 y WO 00/34317). En una realización, el anticuerpo en los métodos que se informan en el presente documento es un anticuerpo humano o humanizado. La ingeniería genética de inmunoglobulinas se describe, por ejemplo, en Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244; Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1117-1125.

30 Una inmunoglobulina en general comprende dos llamados polipéptidos de la cadena ligera de longitud completa (cadena ligera) y dos llamados polipéptidos de la cadena pesada de longitud completa (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera de longitud completa contiene un dominio variable (región variable) (generalmente la porción del extremo amino de la cadena de polipéptidos de longitud completa) que comprende regiones de unión que interaccionan con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera de longitud completa comprende una región constante (generalmente la porción del extremo carboxilo). La región constante de la cadena pesada de longitud completa media en la unión de la inmunoglobulina i) a células que llevan un receptor de Fc gamma (Fc γ R), tal como células fagocíticas, o ii) a células que llevan el receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como el receptor de Brambell. También media en la unión a algunos factores que incluyen factores del sistema del complemento clásico tales como el componente (C1q). El dominio variable de una inmunoglobulina de una cadena ligera o pesada de longitud completa comprende a su vez diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR). Una "cadena pesada de la inmunoglobulina de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección del extremo N al extremo C de un dominio variable (VH) de la cadena pesada de inmunoglobulina, un dominio constante 1 (CH1) de inmunoglobulina, una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio constante 2 (CH2) de inmunoglobulina, un dominio constante 3 (CH3) de inmunoglobulina, y opcionalmente un dominio constante 4 (CH4) de inmunoglobulina en caso de una inmunoglobulina de la subclase IgE. Una "cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección del extremo N al extremo C de un dominio variable de la cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante de la cadena ligera (CL) de inmunoglobulina. Las cadenas de inmunoglobulina de longitud completa se ligan juntas mediante enlaces disulfuro interpolipeptídicos entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina de longitud completa.

50 El término "fragmento de inmunoglobulina" indica dentro de la presente solicitud un polipéptido que comprende al menos el dominio CH2 y el dominio CH3 de una cadena pesada de la inmunoglobulina de longitud completa. Un fragmento de inmunoglobulina también puede comprender secuencias de aminoácidos derivadas no de inmunoglobulina adicionales.

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

65 El término "glicoestructura", como se usa dentro de la presente solicitud, indica un único oligosacárido ligado en N o O definido en un residuo de aminoácido especificado. Así, el término "inmunoglobulina con una glicoestructura G1" indica una inmunoglobulina que comprende en el residuo de aminoácido asparagina en aproximadamente la posición de

aminoácido 297 según el esquema de numeración de Kabat o en la región FAB un oligosacárido biantenarico que comprende solo un residuo de galactosa terminal en los extremos no reductores del oligosacárido. El término "oligosacárido", como se usa dentro de la presente solicitud, indica un sacárido polimérico que comprende dos o más unidades de monosacáridos covalentemente unidas.

5 Para la notación de los diferentes oligosacáridos ligados en N o O en la presente invención, los residuos de azúcar individuales se enumeran desde el extremo no reductor hasta el extremo reductor de la molécula de oligosacárido. La cadena de azúcar más larga se eligió como la cadena básica para la notación. El extremo reductor de un oligosacárido ligado en N o O es el residuo de monosacárido, que está directamente unido al aminoácido del esqueleto de aminoácido de la inmunoglobulina, mientras que el extremo de un oligosacárido ligado en N o O, que se localiza en el extremo opuesto como el extremo reductor de la cadena básica, se llama el extremo no reductor.

15 El término "cromatografía de afinidad", como se usa dentro de la presente solicitud, indica un método de cromatografía que emplea 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 hidrófobos y/o enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales cromatográficos del material de cromatografía. Para recuperar el polipéptido específicamente unido del material de cromatografía de afinidad puede tanto añadirse un ligando competidor como pueden cambiarse las condiciones de cromatografía, tales como valor de pH, polaridad o fuerza iónica del tampón. "Materiales de cromatografía de afinidad" a modo de ejemplo son materiales de cromatografía de quelación de metales tales como Ni(II)-NTA o Cu(II)-NTA, o materiales de cromatografía de afinidad por inmunoglobulinas tales como en una realización de los métodos como se informan en el presente documento, materiales de cromatografía que comprenden proteína A o proteína G covalentemente ligada a ellos, o materiales de cromatografía de afinidad por unión a enzimas tales como materiales de cromatografía que comprenden análogos de sustrato de enzima covalentemente unidos a ellos, cofactores de enzima, o inhibidores de enzima como grupo funcional cromatográfico, o materiales de cromatografía de unión a lectina tales como materiales de cromatografía que comprenden polisacáridos ligados covalentemente a ellos, receptores de la superficie celular, glicoproteínas o células intactas como grupo funcional cromatográfico.

30 El término "glicoestructura definida" indica dentro de la presente solicitud una glicoestructura en la que el residuo de monosacárido en los extremos no reductores de la glicoestructura es de un tipo específico. El término "glicoestructura definida" indica dentro de la presente solicitud una glicoestructura en la que el residuo de monosacárido en el extremo no reductor de las glicoestructuras están definidas y de un tipo específico.

35 El término "que se aplica a" y equivalentes gramaticales del mismo, como se usan dentro de la presente solicitud, indica una etapa parcial de un método de purificación en la que una disolución que contiene una sustancia de interés se pone en contacto con una fase estacionaria. La disolución que contiene la sustancia de interés que va a purificarse pasa a través de la fase estacionaria proporcionando una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en disolución. Dependiendo de las condiciones, tales como, por ejemplo, pH, conductividad, concentración de sales, temperatura y/o velocidad de flujo, algunas sustancias de la disolución se unen a la fase estacionaria y se eliminan con ella de la disolución. Otras sustancias quedan en disolución. Las sustancias que quedan en disolución pueden encontrarse en el flujo a través. El "flujo a través" indica la disolución obtenida después del paso del dispositivo cromatográfico, que puede tanto ser la disolución aplicada que contiene la sustancia de interés como el tampón, que se usa para lavar la columna o para producir la elución de una o más sustancias unidas a la fase estacionaria. La sustancia de interés puede recuperarse de la disolución después de la etapa de purificación por métodos familiares para una persona experta en la materia, tales como, por ejemplo, precipitación, insolubilización por salado, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad, o reducción del volumen de disolvente para obtener la sustancia en forma sustancialmente homogénea.

50 Una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina cuya glicoestructura puede modificarse en los métodos que se informan en el presente documento puede producirse por medios recombinantes. Métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos en el estado de la materia y comprenden la expresión de proteínas en células eucariotas con el posterior aislamiento de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina y purificación a una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina se usa tanto una célula de hibridoma como una célula eucariota, en las que se han introducido uno o más ácidos nucleicos que codifican la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina. En una realización, las células eucariotas están seleccionadas de células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK 293, células COS, células PER.C6, células BHK, células de conejo o células de oveja. En otra realización, la célula eucariota está seleccionada de células CHO, células HEK o células de conejo. Después de la expresión, la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina se recupera de las células (del sobrenadante o de las células después de la lisis). Métodos generales para la producción recombinante de inmunoglobulinas son muy conocidos en el estado de la materia y se informan, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

65 La purificación de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina puede realizarse con el fin de eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en

gel de agarosa y otros muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M, et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005)). Diferentes métodos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad por proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio de modo mixto), cromatografía de adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos de SH), interacción hidrófoba o de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelato metálico (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar), además de combinaciones de los mismos, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico (véase, por ejemplo, Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

La glicoestructura de una inmunoglobulina recombinantemente producida o fragmento de inmunoglobulina se determinará por la línea celular empleada y las condiciones de cultivo empleadas. Con técnicas de procesamiento aguas abajo convencionales no es posible la eliminación selectiva de glicoestructuras específicas.

Con los métodos que se informan en el presente documento, una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glicoestructura definida puede obtenerse en procesamiento aguas abajo. Se ha encontrado que para producir una inmunoglobulina o fragmento FAB de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 tiene que realizarse una incubación secuencial con i) una galactosiltransferasa, ii) una sialiltransferasa, iii) una beta-1,4-galactosidasa, y iv) una sialidasa con el fin de obtener la inmunoglobulina o fragmento FAB de inmunoglobulina con una glicoestructura G1 en forma sustancialmente pura.

El método que se informa en el presente documento permite la producción de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glicoestructura G1 por lo que

- la necesidad de obtener/seleccionar/usar una línea celular que produce una glicoestructura definida es obsoleta,
- no cambia la calidad del producto debido a las etapas de incubación adicionales de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina en comparación con un método sin las etapas de incubación adicionales,
- una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con una glicoestructura definida se produce durante el procesamiento aguas abajo, es decir, después de terminarse la expresión *in vitro*,
- la inmunoglobulina con glicoestructura definida se proporciona con rendimiento mejorado, ya que no se elimina inmunoglobulina con glicoestructura no deseada, sino que toda la inmunoglobulina se convierte enzimáticamente en una glicoestructura definida.

Así, un aspecto que se informa en el presente documento es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glicoestructura G1 que comprende la siguiente etapa:

- incubar con una beta-1,4-galactosiltransferasa,
- incubar con una sialiltransferasa,
- incubar con una beta-1,4-galactosidasa,
- inactivar o eliminar la beta-1,4-galactosidasa, e
- incubar con una sialidasa.

En una realización, la galactosiltransferasa se añade en una a diez alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en dos a siete alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en tres, o cuatro, o cinco, o seis alícuotas.

En una realización, la incubación con la galactosiltransferasa es durante aproximadamente 30 horas a aproximadamente 60 horas.

En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade después de cero a dos horas de incubación. En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade al principio de la incubación.

En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade cinco a veinte horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade seis a doce horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade ocho a diez horas después de haberse añadido la alícuota previa.

Así, un aspecto que se informa en el presente documento es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con glicoestructura G1 que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina,
- incubar el eluato de columna de cromatografía de afinidad con una galactosiltransferasa,

- incubar el producto de reacción de galactosiltransferasa con una sialiltransferasa,
- incubar el producto de reacción de sialiltransferasa con una beta-1,4-galactosidasa,
- eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa, e
- incubar el producto de reacción de beta-1,4-galactosidasa, en el que la actividad de beta-1,4-galactosidasa se había eliminado o inactivado, con una sialidasa.

Se ha encontrado que la galactosiltransferasa tiene que añadirse en más de una alícuota durante el tiempo de incubación. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en una a diez alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en dos a siete alícuotas. En una realización, la galactosiltransferasa se añade en tres, o cuatro, o cinco, o seis alícuotas.

En una realización, la incubación con la galactosiltransferasa es durante aproximadamente 30 horas a aproximadamente 60 horas.

En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade después de cero a dos horas de incubación. En una realización, la primera alícuota de galactosiltransferasa se añade al principio de la incubación.

En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade cinco a veinte horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade seis a doce horas después de haberse añadido la alícuota previa. En una realización, una alícuota de galactosiltransferasa se añade ocho a diez horas después de haberse añadido la alícuota previa.

Otro aspecto que se informa en el presente documento es un método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina con glicoestructura G1 que comprende las siguientes etapas:

- cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina,
- recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo,
- aplicar la inmunoglobulina recuperada o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina a un material de cromatografía de proteína A y recuperar la inmunoglobulina del material de cromatografía de proteína A eluyendo la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina del material de cromatografía de proteína A,
- modificar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina contenida en el eluato de columna de cromatografía de afinidad
 - a) incubando el eluato de columna de cromatografía de afinidad con una galactosiltransferasa,
 - b) incubando el producto de reacción de galactosiltransferasa con una sialiltransferasa,
 - c) incubando el producto de reacción de sialiltransferasa con una beta-1,4-galactosidasa,
 - d) eliminando o inactivando la beta-1,4-galactosidasa,
 - e) incubando el producto de reacción de beta-1,4-galactosidasa, en el que la actividad de beta-1,4-galactosidasa se había eliminado o inactivado, con una sialidasa,
- aplicar el eluato de columna de cromatografía de afinidad enzimáticamente modificado a un material de cromatografía de proteína A y recuperar la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina del material de cromatografía de proteína A y así producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o fusión de inmunoglobulina con glicoestructura G1.

Para la purificación de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, que se han producido, por ejemplo, por métodos de cultivo de células, generalmente puede emplearse una combinación de diferentes etapas de cromatografía. Normalmente, una cromatografía de afinidad por proteína A puede ir seguida de una o dos etapas de separación adicionales. En una realización, las etapas de cromatografía adicionales son una etapa de cromatografía de intercambio catiónico y aniónico, o viceversa. La etapa de purificación final es una llamada "etapa de pulido" para la eliminación de impurezas traza y contaminantes como inmunoglobulinas agregadas, HCP residual (proteína de células huésped), ADN (ácido nucleico de células huésped), virus o endotoxinas. En una realización, la etapa de purificación final es una cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo a través.

Métodos cromatográficos generales y su uso son conocidos para un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Heftmann, E. (ed.), *Chromatography*, 5th edition, Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, New York (1992); Deyl, Z. (ed.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands (1998); Poole, C. F., y Poole, S. K., *Chromatography Today*, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Sambrook, J., et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); o Ausubel, F.M., et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005). En una realización, la galactosiltransferasa es beta-1,4-galactosiltransferasa. En una realización, la galactosiltransferasa es beta-1,4-galactosiltransferasa de leche bovina.

En una realización, la sialiltransferasa es alfa-2,6-sialiltransferasa. En una realización, la sialiltransferasa es alfa-2,6-sialiltransferasa humana.

5 En una realización, la galactosidasa es una beta-1,4-galactosidasa. En una realización, la galactosidasa es una beta-1-3,4-galactosidasa. En una realización, la galactosidasa es beta-1,4-galactosidasa de testículo bovino.

10 En una realización, la sialidasa es una neuraminidasa. En una realización, la neuraminidasa es una neuraminidasa bacteriana. En una realización, la neuraminidasa es alfa-2-3,6,8,9-neuraminidasa. En una realización, la neuraminidasa es de *Arthrobacter ureafaciens*.

15 Los siguientes ejemplos, figuras y secuencias se proporcionan para ayudar en el entendimiento de la presente invención, cuyo alcance verdadero se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de la figura

Figura 1 Esquema del método de producción que se informa en el presente documento.

20 EJEMPLOS

Pueden hacerse analíticas entre las diferentes etapas de síntesis o después de la síntesis completa. Si uno o más de los productos intermedios van a producirse, la síntesis puede acabarse después de cada una de las etapas.

25 El método que se informa en el presente documento se ejemplifica a continuación con diferentes anticuerpos: anticuerpo anti-CD19 que se informa en el documento WO 2011/147834, anticuerpo anti-CCR5 que se informa en el documento WO 2006/103100, anticuerpo anti-HER2 que se informa en el documento WO 99/57134, anticuerpo anti-IL1R que se informa en el documento WO 2005/023872.

30 Materiales y métodos

Tubos de centrifuga membrana 10.000 MWCO, por ejemplo, Vivaspin 500 VS0102 Sartorius o Vivaspin 6 VS0601 Sartorius (para mayores cantidades de anticuerpos)

35 Análisis de ES-EM:

Material:

- Clorhidrato de guanidinio (por ejemplo, Pierce, Cat nº 24110)
- 40 - TCEP (clorhidrato de tris-2-carboxietil-fosfina) (por ejemplo, Pierce, Cat nº 20490)
- Columnas de filtración en gel NAP5 Sephadex G-25 (por ejemplo, GE Healthcare, Cat nº 17-0853-02)
- Ácido fórmico mín. 98% (por ejemplo, Roth, Cat nº 4724,1)
- Acetonitrilo (por ejemplo, Baker, Cat nº 9017)
- 45 - Agua ultrapura (por ejemplo, Baker)

Método de ESI-EM:

50 El anticuerpo se desnaturalizó, se redujo con TCEP y el tampón se intercambió a medio de electropulverización. A partir de aquí, el anticuerpo se midió con un espectrofotómetro de masas de electropulverización. Se determinaron los valores de m/z de la cadena ligera y diferentes cadenas pesadas glicosiladas.

Preparación de muestras (método a modo de ejemplo):

55 La glicerina se eliminó lavando con agua. Las muestras se transfirieron a los tubos de centrifuga Vivaspin preparados y se llenaron con agua ultrapura a aproximadamente 100 µl de volumen. Las muestras se centrifugaron a aproximadamente 10 rpm, el filtrado se desechó. A partir de aquí, las muestras se limpiaron al menos dos veces cada una con aproximadamente 100 µl de agua ultrapura. El líquido residual se transfirió a un tubo de reacción y se llenó con agua ultrapura a aproximadamente 200 µl de volumen /1000 µg de anticuerpo.

60 Para mayores cantidades de anticuerpo (superiores a aprox. 3000 µg de anticuerpo) el procedimiento puede adaptarse a tubos de centrifuga Vivaspin Vivaspin 6 VS0601.

ES 2 548 215 T3

Reducción:

5 Se llevaron 150 µg de anticuerpo a un volumen final de 200 µl con tampón de desnaturalización (clorhidrato de guanidinio 6 M). Se añadieron aproximadamente 30 µl de disolución de TCEP (28,6 mg de TCEP en 1 ml de tampón de desnaturalización). Las muestras se incubaron durante aproximadamente una hora a aproximadamente 37 °C.

Intercambio de tampón:

10 Las columnas de filtración en gel NAP5 se equilibraron con 10 ml de medio de electropulverización (1 % de ácido fórmico en 20 % de acetonitrilo). A partir de aquí, aproximadamente 200 µl de la muestra se transfirieron a la columna. Después del drenaje completo se aplicaron aproximadamente 650 µl de medio de electropulverización a la columna. El anticuerpo se eluyó con aproximadamente 250 µl de medio de electropulverización.

Análisis de ES-EM:

15 Las muestras reducidas se analizaron durante al menos un minuto entre aproximadamente 700 m/z a aproximadamente 2200 m/z

Análisis de MALDI-EM:

20 Material:

- N-Glicosidasa F (por ejemplo, Roche Diagnostics GmbH, Cat nº 1 365 193)
- Resina de intercambiador catiónico AG 50W-X8 (por ejemplo, BioRad, Cat nº 142-1441)
- 25 - Columnas de cromatografía para centrifugación
- Matriz DHB MALDI (por ejemplo, Mass Prep)

Método:

30 Los oligosacáridos N-glucosídicos se escindieron del anticuerpo por digestión con N-glicosidasa F. Los oligosacáridos obtenidos se analizaron por medio de espectrometría de masas de MALDI-TOF después del aislamiento de la proteína.

Digestión enzimática:

35 Se digirieron doscientos cincuenta microgramos de las muestras purificadas con 5 µl de disolución de N-glicosidasa F durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 37 °C.

Purificación:

40 Las muestras digeridas se centrifugaron por medio de tubos de centrifuga Vivaspin. Los oligosacáridos se separaron de la proteína. Los oligosacáridos se purificaron por medio de un intercambiador de cationes.

Análisis:

45 Se mezcló una matriz de un microlitro con 1 µl de muestra y se transfirió sobre la diana. Las muestras se midieron entre 800 m/z y 2500 m/z.

Análisis de HPAEC:

50 Material:

- Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado (por ejemplo, Merck, Cat nº 6346)
- Columnas de filtración en gel NAP5 Sephadex G-25 (por ejemplo, GE Healthcare, Cat nº 17-0853-02)
- Hidróxido sódico al 50 % (por ejemplo, Baker, Cat nº 7067)
- 55 - Acetato sódico anhidro (por ejemplo, Merck, Cat nº 6264)
- N-Glicosidasa F (por ejemplo, Roche Diagnostics GmbH, Cat nº 1 365 193)
- Helio (pureza mín 4,6)
- Agua ultrapura (por ejemplo, Baker, Cat nº 4218)

60 Método de HPAEC:

Las cadenas de oligosacáridos N-glucosídicos se separaron del anticuerpo por escisión con N-glicosidasa F. Los oligosacáridos obtenidos se separaron por medio de una cromatografía de intercambio aniónica (HPAEC) después de aislar la proteína.

65

ES 2 548 215 T3

Disoluciones:

- Tampón fosfato 10 mM, pH 7,2
- N-Glicosidasa F a una concentración de 1 U/μl
- 5 - Eluyente A (0,05 moles/l de NaOH); la disolución se airea con helio durante la preparación de un análisis
- Eluyente B (0,05 moles/l de NaOH + 0,2 moles/l de acetato de Na); la disolución se airea con helio durante la preparación y análisis

Intercambio de tampón:

- 10 La columna de filtración en gel NAP5 se equilibró con 10 ml de tampón fosfato. A partir de aquí, se transfirieron aproximadamente 400 μg de la muestra a la columna. Después del drenaje completo se aplicaron 750 μl de tampón fosfato a la columna. El anticuerpo se eluyó con 450 μl de tampón fosfato. Las muestras se concentraron en tubos de centrifuga Vivaspin preparados a un volumen inferior a 100 μl.

Digestión enzimática:

- 20 Se añadieron dos microlitros de la disolución de N-glicosidasa F (2 U) al eluato concentrado. El eluato se incubó durante aproximadamente 16 h a aproximadamente 37 °C.

Purificación:

- 25 La disolución se transfirió completamente al tubo de centrifuga Vivaspin preparado. Se añadieron aproximadamente 50 μl de agua de ultrapura y la disolución se centrifugó a aproximadamente 5000 x g. A partir de aquí, las muestras se lavaron con aproximadamente 50 μl de agua de ultrapura. El centrifugado se transfirió a una taza y se llenó con agua ultrapura a un volumen final de aproximadamente 140 μl.

Análisis:

- 30 Se inyectaron cincuenta microlitros de la muestra a la columna de HPLC (temperatura de la columna: 30 °C)
Gradiente:

Gradiente para muestras no sializadas:

- 35 Flujo: 0,5 ml/min

mín	% de B	mín	% de B
0	0	37	100
2	0	42	100
15	2	44	0
20	2	55	0
35	3		

Gradiente para muestras sializadas:

- Flujo: 0,5 ml/min

mín	% de B	mín	% de B
0	0	55	50
2	0	57	100
15	2	62	100
20	2	64	0
35	3	75	0

40 Ejemplo 1

Galactosilación

- 45 Materiales:

- Cloruro de manganeso (II) >99%, MW 125,84 g/moles (Sigma-Aldrich, Cat nº 244589-10G)
- Tampón MES, MW 213,9 g/moles (Roche Diagnostics GmbH, Cat nº 10073571001)
- UDP-Galactosa, sal de disodio, MW 610,27 g/moles (Roche Diagnostics GmbH)
- 50 - NaOH al 50 % (Sigma Aldrich, Cat nº 41,541-3) Galactosiltransferasa β-1,4 (Fluka, de leche bovina, Cat nº 48279 WA 10530; 1,13 U/mg)
- Agua ultrapura (Baker)

Secuencia de etapas:

- adición de tampón de reacción
- adición de galactosiltransferasa (3 a 6 veces)
- incubación

Disoluciones:

Tampón de reacción (para 1 l): MnCl₂ (2,52 g), UDP-galactosa (6,10 g), tampón MES (21,33 g)

Los reactivos se pesan y se disuelven en 950 ml de agua ultrapura. Después de eso, el valor de pH de la disolución se ajusta a pH 6,5 a pH 8,5 con 50 % de NaOH.

El tampón coagula y tiene que mezclarse justo antes de uso.

Disolución de galactosiltransferasa:

Se disolvieron 0,887 mg (= 1,0 U) de galactosiltransferasa en 101,2 µl de tampón de reacción.

Preparación de muestras:

A aproximadamente 1000 µg de anticuerpo se añadieron aproximadamente 150 µl de tampón de reacción. Las muestras se diluyeron en agua ultrapura a 300 µl de líquido/1000 µg de anticuerpo.

Reacción enzimática:

A 1000 µg del anticuerpo se añadieron 2,5 µl de la galactosiltransferasa (0,025 U). La adición de la enzima fue en tres a seis alícuotas durante un periodo de tiempo de 30 horas a 60 horas. La temperatura se mantuvo a 30 °C a 34 °C.

Resultados:

Después de la incubación con la enzima el anticuerpo enzimáticamente modificado se obtuvo con un rendimiento como se representa en la siguiente tabla.

Tabla.

anticuerpo antes de la reacción	anticuerpo después de la reacción	G2 [%]	otras glicoestructuras no convertibles
anticuerpo anti-CD19	glicoestructura G2 de anticuerpo anti-CD19	> 80	Manosa 5 (aprox. 8 %) G1-GlcNac (aprox. 5 %) G2-Fuc
anticuerpo anti-CCR5	glicoestructura G2 de anticuerpo anti-CCR5	> 65	Manosa 5 (aprox. 20 %) G2-Fuc (aprox. 8 %) G1-GlcNac (aprox. 4 %)
anticuerpo anti-HER2	glicoestructura G2 de anticuerpo anti-HER2	> 80	G1-GlcNac (aprox. 10 %) G2-Fuc (aprox. 4 %)
anticuerpo anti-IL1R	glicoestructura G2 de anticuerpo anti-IL1R	> 97	G1-GlcNac (aprox. 2 %)

Ejemplo 2

Sialidación

Materiales:

- CMP-Ácido siálico M =658,4 g/moles (Sigma-Aldrich, Cat nº C8271-1MG)
- Sialiltransferasa α-2,6 (Calbiochem, Cat nº 566223)

Secuencia de etapas:

- adición de sialiltransferasa
- adición de CMP-ácido siálico
- incubación

Reacción enzimática:

Para aproximadamente 1000 µg de anticuerpo se añadieron aproximadamente 9 µl de sialiltransferasa (12,9 mU) y 0,25 mg (= 0,38 µmol) de CMP-ácido siálico. Las muestras se incubaron a 30 °C a 37 °C durante aproximadamente 2 horas.

Resultados:

5 Después de la incubación con la enzima se obtuvo el anticuerpo enzimáticamente modificado con un rendimiento como se representa en la siguiente tabla.

Tabla.

anticuerpo antes de la reacción	anticuerpo después de la reacción	G2_1SA [%]	G2_2SA / Man5 [%]	otras glicoestructuras no convertibles
glicoestructura G2 de anticuerpo anti-CD19	glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-CD19	> 75	aprox. 10	G1-GlcNac (+/-1SA)
glicoestructura G2 de anticuerpo anti-CCR5	glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-CCR5	> 65	aprox. 20	G2-Fuc 1SA, G1-GlcNac (+/-1SA)
glicoestructura G2 de anticuerpo anti-HER2	glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-HER2	> 80	<3	G1-GlcNac aprox. 10 % (+/-1SA), G2-Fuc 1SA, G2
glicoestructura G2 de anticuerpo anti-IL1R	glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-IL1R	80-90	10-15	G1-GlcNac (+/-SA)

10 Ejemplo 3

Desgalactosilación

15 Materiales:

- β-1,4-Galactosidasa (Glyco, Cat nº GKX-5014, 200 mU)

Secuencia de etapas:

- 20
- purificación
 - adición de β-1,4-galactosidasa
 - incubación

25 Preparación de muestras:

Las muestras se transfirieron a los tubos de centrifuga Vivaspin preparados y se cargó agua ultrapura a aprox. 100 µl de volumen total. Las muestras se centrifugaron a aprox. 10 rpm, el filtrado se desechó. A partir de aquí, las muestras se lavaron al menos dos veces cada una con aprox. 100 µl de agua ultrapura. El líquido residual se transfirió a un tubo de reacción y se cargó con agua ultrapura a aproximadamente 200 µl de volumen /1000 µg de anticuerpo. La glicerina se eliminó lavando con agua.

30

Para mayores cantidades de anticuerpo (superiores a aproximadamente 3000 µg de anticuerpo) el procedimiento puede adaptarse a tubos de centrifuga Vivaspin Vivaspin 6 VS0601.

35

Reacción enzimática:

Para aproximadamente 1000 µg de anticuerpo se añadieron aproximadamente 30 µl (60 mU) de disolución de β-galactosidasa. Las muestras se incubaron durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 37 °C.

40

Resultados:

Después de la incubación con la enzima el anticuerpo enzimáticamente modificado se obtuvo con un rendimiento como se representa en la siguiente tabla.

45

Tabla.

anticuerpo antes de la reacción	anticuerpo después de la reacción	G1_1SA [%]	otras glicoestructuras no convertibles
glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-CD19	glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-CD19	> 75	Manosa 5 G1_1SA-Fuc G2_2SA G1 (1SA)-GlcNac
glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-CCR5	glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-CCR5	> 65	Manosa 5 (aprox. 20 %) G1-Fuc_1SA G1-GlcNac (+/- 1SA)
glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-HER2	glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-HER2	> 80	G1-GlcNac (aprox. 10 %) (+/- 1SA) G1-Fuc_1SA G0 (de G2)
glicoestructura G2-NANA de anticuerpo anti-IL1R	glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-IL1R	80-90	10-15 % de G2_2SA

5 Ejemplo 4

Desialidación

Materiales:

10

- Columna MabSelectSuRe (Media Scout Mini Column, Atoll, Cat nº 00101050408R)
- Tris(hidroximetil) aminometano (Merck, Cat nº 1,08382)
- NaCl (Merck, Cat nº 1,06404)
- Citrato de tri-sodio dihidratado (Merck, Cat nº 1,06448)

15

- NaOH al 50 % (Sigma Aldrich, Cat nº 41,541-3)
- Neuraminidasa (Roche, Cat nº 10 269 611 001, 1U)

Secuencia de etapas:

20

- purificación (eliminación/inactivación de β -galactosidasa)
- adición de sialidasa
- incubación

Preparación de muestras:

25

Primero, la β -galactosidasa se desactivo / eliminó para prevenir la formación de especies G0.

La β -galactosidasa se eliminó por cromatografía con columnas MabSelectSuRe (manualmente o automatizadas usando un Tecan Roter) con las siguientes etapas:

30

Tabla.

etapa	tampón	pH
equilibrado	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
regeneración	NaOH 0,5 M	-
equilibrado	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
carga	mezcla de reacción	-
lavado 1 *	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
lavado 1	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
lavado 2	Tris 1 M / NaCl 0,6 M	7,4
lavado 3	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,0
elución/recuperación	Citrato 10 mM / NaOH	3,2
lavado 4	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
regeneración	NaOH 0,5 M	-
equilibrado	Tris 25 mM / NaCl 25 mM	7,4
almacenamiento	alcohol bencílico 200 mM / acetato sódico 10 mM	5,0

Después de la eliminación de β -galactosidasa el valor de pH se estableció a pH 5,0 +/- 0,2 con Tris-HCl a pH 9,0. La concentración después de la purificación se midió con un fotómetro.

35

Reacción enzimática:

Para aproximadamente 1000 µg de anticuerpo se añadieron aproximadamente 50 µl (0,5 U) de neuraminidasa. Las muestras se incubaron a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 18 horas.

5

Resultados:

Después de la incubación con la enzima se obtuvo el anticuerpo enzimáticamente modificado con un rendimiento como se representa en la siguiente tabla.

10

Tabla.

anticuerpo antes de la reacción	anticuerpo después de la reacción	G1 [%]	otras glicoestructuras
glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-CD19	glicoestructura G1 de anticuerpo anti-CD19	> 75	Manosa 5 G1-Fuc G2 G1-GlcNac
glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-CCR5	glicoestructura G1 de anticuerpo anti-CCR5	> 65	Manosa 5 (aprox. 20 %) G1-Fuc G1-GlcNac
glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-HER2	glicoestructura G1 de anticuerpo anti-HER2	> 80	G1-GlcNac (aprox. 10 %) G1-Fuc G0
glicoestructura G1-NANA de anticuerpo anti-IL1R	glicoestructura G1 de anticuerpo anti-IL1R	80-90	G2 (10-15 %)

Tiene que señalarse que el rendimiento obtenible de la glicoestructura G1 depende, aparte de la conversión enzimática, también de la pureza de las glicoestructuras del producto de partida. Así, la presencia de glicoestructuras tales como Manosa 5, G0-GlcNac, G1-GlcNac, G0-Fuc, G1-Fuc, G2-Fuc y otras reduce el rendimiento obtenible ya que estas glicoestructuras no pueden convertirse.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con glicoestructura G1 que comprende las siguientes etapas:
- incubar un eluato de columna de cromatografía de afinidad que contiene la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con una galactosiltransferasa,
 - incubar el producto de reacción de galactosiltransferasa con una sialiltransferasa,
 - incubar el producto de reacción de sialiltransferasa con una beta-1,4-galactosidasa,
 - 10 - eliminar o inactivar la beta-1,4-galactosidasa, e
 - incubar el producto de reacción de beta-1,4-galactosidasa, en el que la beta-1,4-galactosidasa se ha eliminado o inactivado, con una sialidasa y así producir una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina o polipéptido de fusión con glicoestructura G1.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la galactosiltransferasa se añade durante la incubación en dos o más alícuotas.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la galactosiltransferasa se añade durante la incubación en tres a seis alícuotas.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la primera alícuota de la galactosiltransferasa se añade después de cero a dos horas de tiempo de incubación.
- 25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque una alícuota de la galactosiltransferasa se añade cada una después de seis a doce horas de tiempo de incubación.

Fig. 1

