

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 677**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 14/735 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2012 PCT/EP2012/070439**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO2013057078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2012 E 12772787 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2768845**

54 Título: **Método de separación para anticuerpos fucosilados**

30 Prioridad:

19.10.2011 EP 11185798

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

26.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE;
JAEGER, CHRISTIANE;
SONDERMANN, PETER y
UMANA, PABLO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 619 677 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

Método de separación para anticuerpos fucosilados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la separación de anticuerpos, específicamente anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación. El método se basa en la afinidad de unión de los anticuerpos a receptores de Fc. La invención se refiere además a la utilización de receptores de Fc para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación.

10 Antecedentes

La IgG1 humana consiste de dos fragmentos Fab (por sus siglas en inglés, "fragment antigen binding", fragmento de unión a antígeno), que comprende las regiones variables responsables del reconocimiento de antígenos y un dominio Fc (fragmento cristalizante) constante, que interactúa con componentes del sistema inmunológico y media en las funciones efectoras inmunológicas, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las estructuras de carbohidrato unidas al sitio de N-glicosilación conservado en la asparagina 297 (Asn297, N297) dentro del dominio CH2 de la región constante son necesarias para mediar en estas funciones efectoras (1-4).

Naturalmente, los oligosacáridos unidos al dominio Fc predominantemente son estructuras de tipo complejo biantenarias con un contenido variable de GlcNAc bisectante (N-acetilglucosamina), galactosas terminales, fucosa nuclear y ácidos siálicos (figura 1).

Los últimos estudios han demostrado que la modificación de la composición de carbohidratos afecta fuertemente a las funciones efectoras inmunológicas mediadas por anticuerpos (3-5). Un nivel bajo de galactosilación afecta positivamente a la activación del complemento mientras que la falta de fucosa nuclear resulta en una afinidad de unión más alta a FcγRIIIa y, de esta manera, incrementa la ADCC (5-7). Se han desarrollado varios enfoques de manipulación del perfil de glucosilación y para generar anticuerpos terapéuticos con funciones biológicas mejoradas (8-10).

Por ejemplo, los anticuerpos glucomanipulados producidos en células de mamífero que sobreexpresan β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT) III y manosidasa (Man) II muestran proporciones altas de oligosacáridos no fucosilados bisectados e inducen una ADCC incrementada como resultado de una afinidad hasta 50 veces más alta para FcγRIIIa (9). Sin embargo, las modificaciones de carbohidrato introducidas mediante sobreexpresión de GnT III, que inhiben la reacción de fucosilación, conducen a anticuerpos no fucosilados sólo parcialmente. Debido a que el dominio Fc de una molécula de IgG porta dos sitios de glucosilación N-ligados, la inhibición parcial de la reacción de fucosilación puede resultar en una distribución variable de la fucosa dentro del pool de anticuerpos. Dicha preparación de anticuerpos podría contener una mezcla de moléculas portadoras de uno o dos residuos de fucosa, y en la que algunos de ellos se encuentran completamente no fucosilados. Evidentemente dichos grados diferentes de no fucosilación influyen sobre la afinidad global para FcγRIIIa y resultan en diferencias de actividad biológica. Por lo tanto, resulta necesaria una caracterización detallada de dicho pool de anticuerpos.

Debido a que la diferencia de afinidad para FcγRIIIa entre IgG fucosiladas y no fucosiladas es de hasta 50 veces, dicha interacción puede utilizarse para separar las especies fucosiladas en grado diferente en un pool de anticuerpos y caracterizarlas independientemente.

Las matrices de cromatografía de afinidad existentes utilizadas para la purificación de IgG no pueden discriminar entre diferentes patrones de glucosilación dentro del pool de IgG, ya que la proteína de captura inmovilizada se une específicamente al esqueleto proteico del anticuerpo. Por ejemplo, la proteína A y la proteína G se unen a la interfaz entre los dominios CH2 y CH3 de la región Fc, mientras que otras proteínas específicas de IgG tales como la proteína L reconocen la parte constante de la cadena ligera kappa (11-13).

Para el enriquecimiento en proteínas que portan estructuras de glicano específicas, se ha utilizado la cromatografía de afinidad para lectina, por ejemplo utilizando la lectina de *Aleuria aurantia* (LAA), la cual se une a los glicanos que contienen fucosa (14). Alternativamente, se han utilizado anticuerpos con diana que reconocen una estructura de carbohidrato específica, por ejemplo anticuerpos específicos para el antígeno Lewis X (15). Aunque dichos métodos pueden resultar adecuados para el enriquecimiento en glucoproteínas que portan un carbohidrato específico, resultan de utilidad limitada para el enriquecimiento en glucoproteínas que *no presentan* un carbohidrato específico, tal como los anticuerpos no fucosilados. Además, ninguno de dichos métodos es específico para anticuerpos y, de esta manera, requeriría una purificación rigurosa de un pool de anticuerpos antes de su aplicación a la matriz de afinidad, para evitar la contaminación por otras proteínas portadoras de la estructura de glicano diana. Finalmente, dichos métodos se basan en lectinas o anticuerpos específicos, los cuales pueden resultar difíciles de obtener y no han sido utilizados con éxito con fines preparativos.

Dada su potencia grandemente incrementada en la inducción de la función efectora inmunológica que resulta de interés para fines tanto experimentales como también terapéuticos, resultaría deseable separar los anticuerpos parcial o totalmente no fucosilados de los totalmente fucosilados presentes en un pool de anticuerpos. La presente invención proporciona un método simple y eficiente para conseguir dicha separación.

El documento nº WO 2010/048313 da a conocer un método de purificación de una proteína que contiene Fc a partir de una muestra, comprendiendo el método la puesta en contacto de una muestra que contiene dicha proteína que contiene Fc con un receptor de Fc neonatal soluble unido a una superficie de soporte.

Okazaki et al., (Journal of Molecular Biology 336(5):1239-1249, 2004) dan a conocer que la reducción de la cantidad de fucosa en los oligosacáridos de IgG1 humana potencia la entalpía de unión y la tasa de asociación entre IgG1 y FcγRIIIa y FcγRIIIa Val158 mediante mediciones de calorimetría de titulación isotérmica y de resonancia del plasmón superficial.

Niwa et al., Clinical Cancer Research 10(18):6248-6255, 2004) dan a conocer que la potenciación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de la IgG1 de bajo contenido en fucosa resulta independiente de los polimorfismos funcionales de FcγRIIIa.

Tojo et al., (Biological & Pharmaceutical Bulletin 32(9):1604-1608, 2009) 9: dan a conocer un enfoque para elevar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de compuestos de anticuerpos utilizando cromatografía de afinidad para lectina.

Descripción de la invención

El objeto de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un método de separación basado en la capacidad de determinados receptores de Fc, tales como FcRγIIIa, de discriminar entre los anticuerpos fucosilados y (parcial o totalmente) no fucosilados. El método utiliza receptores de Fc inmovilizados para separar anticuerpos fucosilados en diferente grado de un pool de anticuerpos con fines tanto analíticos como también preparativos. El método descrito en la presente memoria puede aplicarse analíticamente a la caracterización de la composición de carbohidratos de un pool de anticuerpos. Debido a que permite el cribado de un número elevado de muestras, el método puede utilizarse para, por ejemplo, la selección de clones de células huésped que producen anticuerpos glucomanipulados con un contenido elevado de oligosacáridos no fucosilados. La aplicación preparativa permite la preparación de poblaciones de anticuerpos totalmente no fucosilados o totalmente fucosilados, las diferentes propiedades de unión a FcγRIIIa y actividades biológicas de los cuales pueden ser caracterizadas.

En un primer aspecto, la presente exposición proporciona un método para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación, comprendiendo las etapas de:

- a) proporcionar una población de anticuerpos,
- b) poner en contacto dicha población de anticuerpos con un receptor de Fc inmovilizado sobre un soporte,
- c) eluir los anticuerpos que no se unen específicamente a dicho receptor de Fc, y
- d) eluir los anticuerpos que se unen específicamente a dicho receptor de Fc.

En una realización particular, los anticuerpos son anticuerpos IgG, más particularmente anticuerpos IgG₁.

En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc humana. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos gluco-silados. En una realización específica, los anticuerpos son glucomanipulados para que presenten una estructura de oligosacáridos alterada en la región Fc de los mismos. En una realización todavía más específica, los anticuerpos son glucomanipulados para presentar una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de los mismos en comparación con un anticuerpo no glucomanipulado correspondiente. En una realización, los anticuerpos han sido producidos en una célula huésped manipulada para presentar una actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT) III incrementada en comparación con una célula huésped no manipulada. En una realización más específica, la célula huésped adicionalmente es manipulada para presentar una actividad de α-manosidasa II (ManII) incrementada. La actividad de GnTIII incrementada típicamente resulta de introducir en la célula huésped uno o más polinucleótidos codificantes de uno o más polipéptidos que presentan actividad de GnTIII, es decir, polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en enlace β-1,4 al manósido unido mediante enlace β del núcleo trimanosilo de los oligosacáridos N-ligados. Lo anterior incluye polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, aunque no necesariamente idéntica, a una actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β-1,4-manosil-gluco-proteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), según el comité de nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según mediciones en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En determinadas realizaciones, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio

de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En particular, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II o de GnTI, más particularmente el dominio de localización de la manosidasa II. Alternativamente, el dominio de localización en Golgi se selecciona de entre el grupo que consiste de: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de la

5 α -1,6-fucosiltransferasa nuclear. Una metodología de glucomanipulación que puede utilizarse para que los anticuerpos glucomanipulados presenten una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en su región Fc ha sido descrita en Umana et al., Nat. Biotechnol. 17:176-180, 1999; Ferrara et al., Biotechn. Bioeng. 93:851-861, 2006, y publicaciones de patente PCT n° WO 99/54342, n° WO 2004/065540 y n° WO 03/01187 8.

10 En realizaciones particulares, la afinidad de unión del receptor de Fc para los anticuerpos depende del grado de fucosilación de los anticuerpos. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la afinidad de unión del receptor de Fc para los anticuerpos depende del grado de fucosilación de los anticuerpos. En una realización, en particular en la que los anticuerpos son anticuerpos IgG, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En una realización particular, el receptor de Fc es Fc γ RIIIa. En una realización más específica, el receptor de Fc es Fc γ RIIIa(V158). En

15 algunas realizaciones, en particular en las que los anticuerpos comprenden una región Fc humana, el receptor de Fc es humano. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc recombinante (es decir, el receptor de Fc se obtiene mediante producción recombinante).

20 En una realización, el soporte sobre el que se inmoviliza el receptor de Fc es una matriz de polímero. La matriz de polímero típicamente presenta forma de perla. En una realización, la matriz de polímero es agarosa entrecruzada o un derivado de la misma. En una realización específica, la matriz de polímero es Sepharose® (agarosa entrecruzada, disponible de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). En otra realización, la matriz de polímero es poli(estireno-divinilbenceno) entrecruzado. En una realización específica, la matriz de polímero es POROS® (poli(estireno-divinilbenceno) entrecruzado, disponible de Applied Biosystems, Foster City, USA). El receptor de Fc

25 puede inmovilizarse sobre el soporte de diversas maneras. El experto en la materia podrá determinar fácilmente el método de inmovilización apropiado basándose en las propiedades del soporte. Por ejemplo, la inmovilización sobre una matriz de polímero típicamente se lleva a cabo mediante una reacción química de la proteína que debe inmovilizarse y grupos funcionales (por ejemplo grupos hidroxilo, grupos aldehído o grupos epóxido) comprendidos en la matriz. Las matrices de polímero adecuadas, así como las reacciones y protocolos de acoplamiento, son bien conocidos de la técnica. La inmovilización sobre dos soportes diferentes también se describe en los Ejemplos, posteriormente en la presente memoria. En una realización, el soporte no es una célula o una membrana celular. En determinadas realizaciones, el método es un método cromatográfico. En una de dichas realizaciones, el soporte está comprendidos en una columna de cromatografía. En una de dichas realizaciones, la puesta en contacto de la

30 población de anticuerpos con el receptor de Fc se lleva a cabo pasando la población de anticuerpos por la columna de cromatografía.

35 En realizaciones particulares, la población de anticuerpos se purifica. En determinadas realizaciones, la población de anticuerpos se purifica mediante afinidad, en particular se purifica mediante afinidad utilizando proteína A o proteína G. La purificación mediante afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, como purificación por lotes mediante la incubación de la población de anticuerpos con una matriz de afinidad o como purificación cromatográfica pasando la fase móvil de la población de anticuerpos por la fase estacionaria de matriz de afinidad. En una realización, la población de anticuerpos se purifica mediante cromatografía de afinidad. En una realización más específica, la población de anticuerpos se purifica mediante cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G, en particular cromatografía de afinidad de proteína A. En otras realizaciones, la población de anticuerpos se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño, o mediante una combinación de cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño.

40 En una realización, la población de anticuerpos se proporciona en solución. En una realización más específica, la población de anticuerpos se proporciona en una solución tamponada. En una realización, la solución tamponada presenta un valor de pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,5, en particular un valor de pH de aproximadamente 8. En una realización, la solución tamponada es una solución tamponada de Tris. En una realización todavía más específica, la solución tamponada es Tris 10 mM, glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8 o Tris 20 mM, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la población de anticuerpos con el receptor de Fc se llevó a cabo en una solución tamponada. En una particular de dichas realizaciones, la solución tamponada es igual a la solución tamponada en la que se proporciona la población de anticuerpos. En una realización, se purifica la población de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G, en particular cromatografía de afinidad de proteína A, y la puesta en contacto con el receptor de Fc se lleva a cabo en la misma solución tamponada en la que se obtiene la población de anticuerpos tras dicha cromatografía de afinidad (incluyendo la neutralización de la solución de anticuerpos tras la elución respecto de la proteína A). En realizaciones particulares, no se requiere ninguna etapa intermedia entre la purificación de la población de anticuerpos y la puesta en contacto con el receptor de Fc.

45 En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de:

65 c1) Lavado del soporte

En una realización, dicho lavado comprende poner en contacto el soporte con una solución tamponada que permite la unión específica de los anticuerpos con el receptor de Fc que debe mantenerse, seguido de la eliminación de dicha solución tamponada. En una realización, la solución tamponada presenta un valor de pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,5, en particular un valor de pH de aproximadamente 8. En una realización, la solución tamponada es una solución tamponada de Tris. En una realización todavía más específica, la solución tamponada es Tris 10 mM, glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8 o Tris 20 mM, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8. En una realización, dicha solución tamponada es la misma que la solución tamponada en la que se proporcionan los anticuerpos. En una realización, se utiliza la misma solución tamponada para proporcionar la población (purificada) de anticuerpos en la misma (etapa a), para la puesta en contacto de la población de anticuerpos con el receptor de Fc (etapa b), para la elución de los anticuerpos no unidos específicamente al receptor (etapa c) y para el lavado del soporte (etapa c1).

En una realización particular, el método permite la separación de subpoblaciones de anticuerpos en la que la mayoría de anticuerpos comprende residuos de fucosa en ninguno, en uno o en los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo. En una realización particular adicional, el método permite la separación de anticuerpos que presentan un grado de fucosilación de por lo menos 90%, preferentemente de por lo menos 95%, anticuerpos que presentan un grado de fucosilación inferior a 20%, preferentemente inferior a 10%, y anticuerpos que presentan un grado de fucosilación de entre aproximadamente 10% y 75%, preferentemente de entre aproximadamente 20% y 60%. En una realización, el método resulta adecuado para la separación de una subpoblación de anticuerpos que consiste esencialmente de anticuerpos parcialmente fucosilados y totalmente no fucosilados. En una realización, el método resulta adecuado para la separación de subpoblaciones de anticuerpos que consiste esencialmente de anticuerpos que comprende residuos de fucosa en ninguno o en uno de los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo. En una realización, el método resulta adecuado para la separación de subpoblaciones de anticuerpos que consiste esencialmente de anticuerpos que comprende residuos de fucosa en los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo.

En determinadas realizaciones, el método presenta un propósito analítico. En otras realizaciones, el método presenta un propósito preparativo.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de:

e) Recolectar los anticuerpos eluidos de la etapa c) y/o de la etapa d)

En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de:

f) Utilización de los anticuerpos recolectados para fines experimentales o terapéuticos

En una realización, los anticuerpos eluidos se detectaron mediante la medición de la absorbancia de UV a una longitud de onda de 280 nm.

En una realización, la elución de la etapa c) comprende la separación de los anticuerpos que quedan libres en la población de anticuerpos tras la puesta en contacto en la etapa b). En el caso de que el soporte se encuentre comprendido en una columna de cromatografía y la puesta en contacto de la población de anticuerpos con el receptor de Fc se lleve a contacto pasando la población de anticuerpos por la columna de cromatografía, se encontraron los anticuerpos eluidos en la etapa c) en el eluido de la columna de cromatografía. En una realización, los anticuerpos eluidos en la etapa c) son anticuerpos totalmente fucosilados. En una realización más específica, los anticuerpos eluidos en la etapa c) presentan un grado de fucosilación de por lo menos 90%, preferentemente de por lo menos 95%. En una realización, la mayoría de los anticuerpos eluidos en la etapa c) comprende residuos de fucosa en cada uno de los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo.

En realizaciones particulares, la elución de la etapa d) comprende la puesta en contacto del soporte con una solución tamponada que interrumpe la unión de los anticuerpos al receptor de Fc. En una de dichas realizaciones, la solución tamponada presenta un valor de pH de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, preferentemente en el intervalo de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5. En una realización, la solución tamponada es una solución tamponada de Tris. En una realización, los anticuerpos eluidos en la etapa d) son anticuerpos parcialmente fucosilados y/o totalmente no fucosilados. En una realización más específica, los anticuerpos eluidos en la etapa d) presentan un grado de fucosilación inferior a 90%, preferentemente inferior a 75%, más preferentemente inferior a 60%. En una realización, la mayoría de los anticuerpos eluidos en la etapa d) comprende residuos de fucosa en cada uno de los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo.

En una realización particular, la elución de la etapa d) se llevó a cabo bajo diferentes valores de pH. En una realización, los valores de pH se encuentran comprendidos en el intervalo de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, preferentemente en el intervalo de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5. En una realización específica, los valores de pH comprenden 4,6 y 4,2. En otra realización particular, la elución de la etapa d) permite la separación de anticuerpos parcialmente fucosilados y anticuerpos totalmente no fucosilados. En una

realización más específica, la elución de la etapa d) permite la separación de anticuerpos que presentan un grado de fucosilación inferior a 90%, preferentemente inferior a 10%, y anticuerpos que presentan un grado de fucosilación de entre aproximadamente 10% y 75%, preferentemente de entre aproximadamente 20% y 60%. En todavía otra realización particular, la elución de la etapa d) permite la separación de subpoblaciones de anticuerpos en las que la mayoría de los anticuerpos comprende residuos de fucosa en uno de los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo, o la mayoría de anticuerpos comprende residuos de fucosa en ninguno de los dos N-glicanos de la región Fc de anticuerpo. En algunas realizaciones, la elución de la etapa d) se lleva a cabo poniendo en contacto secuencialmente el soporte con una serie de soluciones tamponadas que interrumpen la unión de los anticuerpos que presentan grados diferentes de fucosilación al receptor de Fc. En una específica de dichas realizaciones, las soluciones tamponadas presentan diferentes valores de pH. En una realización, los valores de pH se encuentran comprendidos en el intervalo de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, preferentemente en el intervalo de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5. En una realización específica, los valores de pH comprenden 4,6 y 4,2. En una realización, las soluciones tamponadas son soluciones tamponadas de Tris. En una realización más específica, las soluciones tamponadas son Tris 10 mM, glicina 50 mM, NaCl 100 mM o Tris 20 mM, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM con diferentes valores de pH.

En un aspecto adicional, la exposición proporciona la utilización de un receptor de Fc en un método para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En una realización particular, el receptor de Fc es Fc γ R11a. En una realización más específica, el receptor de Fc es Fc γ R11a(V158). En una realización, el receptor de Fc es un ser humano. En una realización adicional, el receptor de Fc es un receptor de Fc recombinante. En una realización particular, el receptor de Fc se inmoviliza sobre un soporte. El soporte puede incorporar cualesquiera de las características, individualmente o en combinación, indicadas en los párrafos anteriores en relación al soporte utilizado en el método de la invención.

En todavía otro aspecto, la exposición proporciona un receptor de Fc inmovilizado sobre un soporte para la utilización en un método para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación, tal como el método de la invención. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En una realización particular, el receptor de Fc es Fc γ R11a. En una realización más específica, el receptor de Fc es Fc γ R11a(V158). En una realización, el receptor de Fc es un ser humano. En una realización adicional, el receptor de Fc es un receptor de Fc recombinante. El soporte puede incorporar cualesquiera de las características, individualmente o en combinación, indicadas en los párrafos anteriores en relación al soporte utilizado en el método de la invención.

Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se defina de otra manera a continuación. El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que comprenda una región de Fc o una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. El término comprende además proteínas de fusión que comprenden una región Fc o una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

La expresión "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que presenta la estructura de un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena pesada presenta una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido de una región bisagra (HR) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominado región constante de cadena pesada. En el caso de una inmunoglobulina de clase IgE, la cadena pesada adicionalmente presenta un dominio CH4. Por lo tanto, una cadena pesada de inmunoglobulina es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de los dominios siguientes: VH-CH1-HR-CH2-CH3-(CH4). De manera similar, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL), también denominado región constante de cadena ligera. Por lo tanto, una cadena ligera de inmunoglobulina es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de los dominios siguientes: VL-CL. La cadena pesada de una inmunoglobulina puede asignarse a cinco tipos: α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE) y γ (IgG), or μ (IgM), algunos de los cuales puede dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo: γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina puede asignarse a dos tipos: kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente de dos fragmentos de Fab y una región Fc, unidos mediante la región bisagra de inmunoglobulina.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente

La expresión "región Fc" o "dominio Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una

cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. La expresión incluye las regiones de Fc de secuencia nativa y las regiones de Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede encontrarse presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o en la región constante se lleva a cabo según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se indica en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir las variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina, así como variantes que presentan alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no reducen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina de mediar en funciones efectoras (tal como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, puede deleccionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse según reglas generales conocidas de la técnica de manera que presenten un efecto mínimo sobre la actividad (ver, por ejemplo, Bowie et al., *Science* 247:1306-10, 1990).

El término "fucosilación" se refiere a la presencia de residuos de fucosa dentro de los oligosacáridos unidos al esqueleto peptídico de un anticuerpo. Específicamente, un anticuerpo fucosilado comprende fucosa unida mediante enlace $\alpha(1,6)$ en el residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) interno en uno o ambos oligosacáridos N-ligados unidos a la región Fc de anticuerpo, por ejemplo en la posición Asn 297 del dominio Fc de la IgG₁ humana (numeración EU de los residuos de la región Fc). Asn297 también puede estar situada aproximadamente ± 3 aminoácidos cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a las variaciones de secuencia menores en las inmunoglobulinas.

El "grado de fucosilación" es el porcentaje de oligosacáridos fucosilados respecto a la totalidad de los oligosacáridos identificados en una muestra de anticuerpos tratada con N-glucosidasa F mediante EM MALDI-TOF. En una muestra de un "anticuerpo totalmente fucosilado" esencialmente la totalidad de los oligosacáridos comprende residuos de fucosa, es decir, se encuentra fucosilada. En una realización, un anticuerpo totalmente fucosilado presenta un grado de fucosilación de por lo menos 90%. De acuerdo con lo anterior, un anticuerpo individual en dicha muestra típicamente comprende residuos de fucosa en cada uno de los dos oligosacáridos N-ligados en la región Fc. A la inversa, en una muestra de un anticuerpo "totalmente no fucosilado" esencialmente ninguno de los oligosacáridos se encuentra fucosilado, y un anticuerpo individual en dicha muestra comprende residuos de fucosa en ninguno de los dos oligosacáridos N-ligados en la región Fc. En una realización, un anticuerpo totalmente no fucosilado presenta un grado de fucosilación de por lo menos 10%. En una muestra de un "anticuerpo parcialmente fucosilado" sólo parte de los oligosacáridos comprende fucosa. Un anticuerpo individual en dicha muestra puede comprender residuos de fucosa en ninguno, uno o ambos oligosacáridos N-ligados en la región Fc, con la condición de que esencialmente ni la totalidad de los anticuerpos individuales de la muestra comprenda residuos de fucosa en ninguno de los oligosacáridos N-ligados en la región Fc, ni esencialmente la totalidad de los anticuerpos individuales de la muestra comprenda residuos de fucosa en ambos oligosacáridos N-ligados en la región Fc. En una realización, un anticuerpo parcialmente fucosilado presenta un grado de fucosilación de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 75%.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "glucomanipular, glucomanipulado, glucomanipulación" se refieren a cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones post-traduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo que altera el patrón de glucosilación del polipéptido. La glucomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del grupo de cadena lateral de los aminoácidos individuales o de las estructuras oligosacáridas, así como combinaciones de dichos enfoques. La glucomanipulación incluye además la manipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para conseguir una glucosilación alterada de las glucoproteínas expresadas en la célula. Además, la glucomanipulación incluye los efectos de las mutaciones y del medio celular sobre la glucosilación. En una realización, un anticuerpo glucomanipulado resulta de la alteración de la actividad de glucosiltransferasa en la célula huésped productora de dicho anticuerpo. Entre las glucosiltransferasas se incluyen, por ejemplo, $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT), $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI), $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII) y $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa. En una realización particular, el anticuerpo glucomanipulado resulta de una actividad de glucosiltransferasa y/o actividad de fucosiltransferasa alteradas en la célula huésped productora de dicho anticuerpo. Un anticuerpo con una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en su región Fc puede obtenerse, por ejemplo, mediante la producción de un anticuerpo en una célula huésped que presenta una actividad incrementada de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), opcionalmente además una actividad incrementada de manosidasa II (ManII), o una célula huésped que presenta una actividad reducida de $\alpha(1,6)$ fucosiltransferasa.

"Fc γ RIIIa (V158)" se refiere a la isoforma de Fc γ RIIIa (también conocido como CD16a; ver Uni Prot. nº P08637,

NCBI nº de acceso NP_000560 para la proteína humana) que presenta un residuo de valina (V) en la posición aminoácida 158. Se demostró que la unión de IgG a FcγRIIIa(V158) era mejor que la unión a FcγRIIIa(F158) (17).

5 La expresión "se une específicamente" se refiere a que la unión es selectiva para el receptor de Fc y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un anticuerpo de unirse a un receptor de Fc puede medirse mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) u otras técnicas que resultarán familiares para el experto en la materia, por ejemplo resonancia de plasmón superficial (SPR), tal como se indica en la presente memoria.

10 La expresión "afinidad de unión" se refiere a la magnitud de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo un receptor) y su pareja de unión (por ejemplo un ligando). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X para su pareja Y puede representarse de manera general con la constante de disociación (K_D), que es la proporción entre las constantes de tasa de disociación y de asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). De esta manera, afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de tasa, con la condición de que la proporción entre las constantes de tasa siga igual. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos y conocidos de la técnica, incluyendo los indicados en la presente memoria. Un método particular para medir la afinidad es la resonancia del plasmón superficial (RPS).

25 El término "purificado" utilizado en relación a una población de anticuerpos se refiere a que la población de anticuerpos se encuentra esencialmente libre de proteínas no anticuerpos no relacionados. Se conocen de la técnica diversos métodos para la purificación de anticuerpos, incluyendo la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Una población de anticuerpos "purificado por afinidad" se refiere a una población de anticuerpos que ha sido purificada utilizando una matriz de afinidad a la que los anticuerpos, pero no proteínas no anticuerpos no relacionadas, se unen específicamente, por ejemplo una matriz de afinidad que comprende proteína A o proteína G.

30 La expresión "solución tamponada" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una solución que presenta un valor de pH definido, típicamente que comprende un agente tamponador que estabiliza el pH de la solución. Los agentes tamponadores son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, sales citrato, sales acetato, sales histidina, sales succinato, sales malato, sales fosfato, sales lactato o tris(hidroximetil)aminometano (Tris).

35 El término "mayoría" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a más de 50%, preferentemente a más de 60%, más preferentemente más de 70% en total.

40 Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1. Oligosacárido N-ligado unido a Asn297 del dominio Fc de IgG1 humana. Los azúcares en negrita definen el núcleo pentasacárido; la adición de los otros residuos sacáridos es variable. GlcNAc: N-acetilglucosamina; Fuc: fucosa; Man: manosa; Gal: galactosa; NeuAc: ácido N-acetilneuramínico.

50 Figura 2. Purificación de FcγRIIIa(V158) humana soluble. A) Cromatograma de cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Línea continua: A_{280nm} ; línea de puntos: gradiente. B) Cromatograma de la cromatografía de exclusión por tamaño (CET). Línea continua: A_{280nm} . C) SDS PAGE, con tinción de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular [kDa]; carril 2: FcγRIIIa(V158) reducido. D) Cromatograma de CET analítica (A_{280nm}). inyección de 50 μ g de muestra.

55 Figura 3. Cromatografía analítica de FcγRIIIa(V158). Cromatograma (A_{280nm}) para 10 μ g de A) IgG glucomanipulado "A"; B) IgG de tipo salvaje "A"; C) IgG glucomanipulado "B"; D) IgG de tipo salvaje "B". El pico correspondiente a la fracción de anticuerpo con un contenido elevado de glicanos no fucosilados ("pico unido") se señala con un cuadrado negro. El área del "pico unido" es la siguiente: A) 66% del área total de pico (48% no fucosilación, determinado según EM MALDI-TOF); B) 26% del área total de pico (10% no fucosilación según EM MALDI-TOF); C) 75% del área total de pico (75% no fucosilación según EM MALDI-TOF); D) 31% del área total de pico (9% no fucosilación según EM MALDI-TOF).

60 Figura 4. Evaluación de la cromatografía analítica de FcγRIIIa(V158). Porcentaje del área del "pico unido" de la columna de cromatografía de FcγRIIIa(V158) del área total de pico, en función del porcentaje de no fucosilación determinado mediante EM MALDI-TOF. A) Mezclas de IgG "A" glucomanipulado y de tipo salvaje (IgG glucomanipulada 0-100%). B) Mezclas de IgG glucomanipulada y de tipo salvaje "B" (IgG glucomanipulada 0-100%).

65

Figura 5. Comparación entre la cromatografía de proteína A seguido de EM MALDI-TOF y la cromatografía de proteína A con cromatografía posterior de FcγRIIIa(V158) como dos métodos diferentes de análisis del grado de fucosilación de los anticuerpos purificados a partir de sobrenadante de cultivo celular (IgG glucomanipulada "C"). Porcentaje del área del "pico unido" de la columna de cromatografía de FcγRIIIa(V158) del área total de pico, en función del porcentaje de no fucosilación determinado mediante EM MALDI-TOF.

Figura 6. Cromatografía preparativa de FcγRIIIa(V158). Cromatograma para la IgG glucomanipulada "A". La IgG "A" eluyó en tres picos: el pico 1 es el eluido de la columna; los picos 2 y 3 eluyeron con dos etapas de pH. Se indican los pools de los picos 1, 2 y 3. Línea continua: A_{280nm}; línea de puntos: gradiente; línea discontinua: valor de pH.

Figura 7. Actividad biológica de las fracciones de anticuerpos recolectadas a partir de la cromatografía preparativa de FcγRIIIa(V158). Se llevaron a cabo ensayos de ADCC para los 3 picos eluidos, así como del material de partida (pool de anticuerpos cargado en la columna de FcγRIIIa(V158)) para las IgG glucomanipuladas "A" (A) y "B" (B). Cuadrados negros: material de partida; rombos blancos: pico 1; triángulos negros: pico 2; círculos negros: pico 3; cuadrados blancos (sólo mostrados en B): IgB de tipo salvaje "B" (no glucomanipulada).

Figura 8. Interacción de la FcγRIIIa(V158) humana soluble con fracciones de anticuerpos recolectadas de la cromatografía preparativa de FcγRIIIa(V158), analizada mediante resonancia del plasmón superficial. Sensogramas y ajustes para A) IgG "B", pico 1 (analizado en estado de equilibrio); B) IgG "B", pico 2; C) IgG "B", pico 3; D) pool de anticuerpos de IgG "B" cargado en la columna de FcγRIIIa(V158). E) Sensograma de IgG "B" de tipo salvaje sin glucomanipulación (analizado en estado de equilibrio).

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos de métodos de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1

Producción y purificación de FcγRIIIa(V158)K₆H₆ humana soluble

Se produjo FcγRIIIa(V158) humana soluble con etiquetas C-terminales de (lisina)₆ y de (histidina)₆ (ver las SEC ID n° y n° 2) mediante la transfección de células HEK293-EBNA con el vector de expresión de mamífero utilizando la transfección con fosfato de calcio.

Para la transfección, se cultivaron las células como cultivos de monocapas adherentes en matraces T utilizando un medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v), y se transfectaron al encontrarse a un nivel de confluencia de entre 50% y 80%. Para la transfección de un matraz T150, se sembraron, por ejemplo, 15 millones de células 24 horas antes de la transfección en 25 ml de medio de cultivo DMEM complementado con FCS (al 10% v/v concentración final) y las células se introdujeron en un incubador a 37°C durante la noche con una atmósfera de 5% de CO₂. Para cada matraz T150 que debía transfectarse, se preparó una solución de ADN, CaCl₂ y agua mediante la mezcla de 94 µg de ADN total de vector plásmido en agua hasta un volumen final de 469 µl y 469 µl de una solución 1 M de CaCl₂. A esta solución se añadieron 938 µl de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluyó con 10 ml de DMEM suplementado con FCS al 2% (v/v), y se añadió al matraz T150 en lugar del medio existente. A continuación se añadieron 13 ml de medio de transfección. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante aproximadamente 17 a 20 horas y después se sustituyó el medio por 25 ml de DMEM, FCS al 10%. El medio de cultivo condicionado se recolectó 7 días después del intercambio de medios mediante centrifugación durante 15 minutos a 210 x g; la solución se esterilizó mediante filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida sódica a una concentración final de 0,01% (p/v), y se reservó a 4°C.

La proteína secretada se purificó mediante cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (figura 2A, B).

Para la cromatografía de quelatos metálicos, se cargó el sobrenadante en un cartucho NiNTA Superflow (volumen de columna: 5 ml; Qiagen, Alemania) equilibrada con tampón A (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7.4) at 4 ml/min. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con por lo menos 10 volúmenes de columna de tampón A. Se eluyó FcγRIIIa(V158) con un gradiente hasta tampón B (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, pH 7). El gradiente consistía de tres etapas: 1) tampón B 0 a 45% en 8 volúmenes de columna, 2) tampón B 45 a 100% en 2 volúmenes de columna y 3) 100% de tampón B en 2 volúmenes de columna. El segundo pico de elución se agrupó y se concentró utilizando una unidad de filtración centrífuga (Amicon Ultra MWCO 10 kD; Millipore, USA) antes de cargarlo en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (HiLoad 16/60 Superdex 75; GE Healthcare, Suecia) equilibrada con MOPS 2 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02% (p/v), pH 7,4.

La concentración de proteínas de las muestras de proteínas purificadas se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. Se analizó mediante SDS-PAGE la pureza y el peso molecular de la FcγRIIIa(V158) humana recombinante en presencia y en ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie (InstantBlue™ de Expedeon). Se utilizó el sistema de gel premojado NuPAGE® (Bis-Tris al 4-12%, Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (figura 2C). El contenido agregado de la proteína (muestra de 50 µg) se analizó utilizando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 75 10/300GL (GE Healthcare, Suecia) en tampón de migración de MOPS 2 mM, NaCl 150 mM y NaN₃ al 0,02% (pH 7,3), a 25°C (figura 2D).

Ejemplo 2

Análisis de fucosilación de anticuerpos

Generación de fragmentos Fc a partir de IgG humana. Los anticuerpos se incubaron durante 72 horas a 25°C en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM con 0,45 U de plasmina (Roche, Suiza) por cada mg. Los fragmentos Fc cortados se separaron de los fragmentos Fab utilizando perlas con proteína A, GE Healthcare; se lavaron con Tris 50 mM, pH 8,0, glicina 100 mM y NaCl 150 mM. Los fragmentos Fc se eluyeron con Tris 50 mM, pH 3,0, glicina 100 mM y NaCl 150 mM. El eluido se neutralizó mediante la adición de Tris 2 M 1:40 v/v, pH 8,0, y se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex S200 10/300 GL, GE Healthcare). Las muestras se concentraron y se intercambió el tampón por Tris 20 mM, pH 8 (Amicon, Millipore).

Liberación de oligosacáridos N-ligados a partir de fragmentos Fc humanos. Se utilizaron diferentes enzimas para hidrolizar los glicanos N-ligados de los fragmentos Fc humanos. Los oligosacáridos N-ligados se cortaron a partir de 1 mg de fragmento Fc mediante incubación con 0,005 U de PNGasa F recombinante (QAbio, USA). Para la liberación de los carbohidratos de los fragmentos Fc utilizando Endo S no etiquetada (Genovis, Suecia) y Endo H (QAbio, USA), las muestras se incubaron en una proporción molar de 1:20 con Endo S en combinación con 0,1 U/mg de Endo H. Todas las reacciones se incubaron en Tris 20 mM, pH 8,0, a 37°C durante 16 horas.

Liberación de oligosacáridos N-ligados a partir de IgG humana completa. Para la liberación de carbohidratos de la IgG humana entera utilizando Endo S y Endo H no etiquetadas, se intercambió el tampón de las muestras en Tris 20 mM, pH 8,0 (Amicon 5.000 MWCO, Millipore) y se incubaron en una proporción molar de 1:7 con Endo S combinado con 0,1 U/mg de Endo H a 37°C durante 16 horas.

Tratamiento con carboxipeptidasa B. Para eliminar la heterogeneidad causada por la lisina C-terminal, las muestras se incubaron adicionalmente con carboxipeptidasa B (Roche, 1 mg/ml). Por lo tanto, se añadió 1 µl de carboxipeptidasa B por cada 50 µg de proteína a la reacción de endoglucosidasa y se incubó nuevamente durante 1 hora a 37°C. Tras la digestión, las muestras se purificaron utilizando proteína A (Poros A 20, Applied Biosystems) y se neutralizó con Tris 2 M 1:40 v/v, pH 8,0.

Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF. Se analizaron los perfiles de oligosacáridos neutros para las IgG humanas mediante espectrometría de masas (Autoflex, Bruker Daltonics GmbH) en modo de iones positivos según Papac et al. (18).

Análisis de EM-IEP de estructuras de glicano de fragmentos Fc humanos mediante infusión directa (detección fuera de línea). Se inyectaron 20 a 50 µg (hasta 90 µl) de anticuerpo tratado con las proteasas plasmina y carboxipeptidasa B y con las endoglucosidasas Endo S y Endo H en una columna Sephadex G25 autoempaquetada ECO SR (5x250 mm) (KronLab) equilibrada con ácido fórmico al 2% (v/v) y acetonitrilo al 40% (v/v) a un caudal de 0,5 ml/min. durante 30 minutos. La muestra de anticuerpos inyectada se desaló aplicando una elución isocrática durante 8 minutos con ácido fórmico al 2% (v/v) y acetonitrilo al 40% (v/v) a un caudal de 1 ml/min. La elución de la proteína desalada se registró mediante UV a 280 nm y la muestra eluida (volumen: aproximadamente 200 a 300 µl) se recolectó en un vial de reacción de 1,5 ml. Se rellenó manualmente una aguja de vidrio recubierta de metal (Proxeon Biosystems Nano ESI-needles, nº de cat. ES387) con una alícuota de la muestra desalada, se insertó en la fuente de nanopulverización del instrumento espectrómetro de masas y se pulverizó en un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF II de Waters o en un espectrómetro de masas Q-Star Elite de Applied Biosystems. Se captaron los espectros de EM utilizando un voltaje capilar de 1.000 V, un voltaje de cono de 30 V en un intervalo de masas de 1.000 a 2.000 m/z en modo de iones positivos utilizando una temperatura de la fuente de 80°C. La temperatura de desolvatación se encontraba desactivada. Se captaron los datos de EM durante 2 a 3 minutos utilizando el software del instrumento correspondiente. Se determinaron las masas molares de los fragmentos Fc diméricos que comprendían diferentes combinaciones de estructuras de glicano truncadas por las endoglucosidasas aplicadas (es decir, moléculas en las que ambas cadenas peptídicas portaban únicamente residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc/GlcNAc), en las que una de las cadenas peptídicas porta adicionalmente un residuo de fucosa (GlcNAc+Fuc/GlcNAc) y moléculas en las que ambas cadenas peptídicas porta residuos de fucosa (GlcNAc+Fuc/GlcNAc+Fuc) a partir del patrón de m/z correspondiente de las especies de fragmento Fc utilizando un software desarrollado en el propio laboratorio. Las proporciones relativas de los tres fragmentos Fc diméricos

residualmente glucosilados diferentes se calcularon con el mismo software del propio laboratorio utilizando la suma de áreas de pico del espectro de m/z de una variante de glucosilación distinta.

Análisis de EM-IEP de estructuras de glicano de fragmentos Fc humanos mediante CL/EM (detección en línea). Se puso en práctica el método de CL-EM en un Agilent Cap LC1100 acoplado a un espectrómetro de masas QToF II (Waters). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Phenomenex Jupiter C18 (tamaño de partícula: 5 μ , tamaño de poro: 300 Å, 1x25 mm). El eluyente A era ácido fórmico al 0,5% (v/v), el eluyente B era isopropanol al 70% (v/v), acetonitrilo al 20% (v/v), agua al 9,5% (v/v) y ácido fórmico al 0,5% (v/v). El caudal era de 40 μ l/min.; la separación se llevó a cabo a 75°C utilizando 2 μ g de proteína en un volumen final de 10 μ l.

Ejemplo 3

Cromatografía analítica de Fc γ R11a

Preparación de la matriz de afinidad. Se intercambió el tampón de 10 mg de Fc γ R11a(V158) por fosfato sódico 0,1 M, NaN₃ al 0,05 (p/v), pH 7, utilizando un dispositivo de filtración centrífuga (Amicon Ultra MWCO 10 kD, Millipore, USA) y se concentró hasta un volumen final de 1,2 ml. Se determinó la concentración de proteína mediante espectroscopía de UV midiendo la densidad óptica a 280 nm y ajustando a 8 mg/ml. Se añadieron 440 μ l de perlas POROS AL (Applied Biosystems, USA), correspondientes a 0,14 g de perlas secas, a la solución de proteínas. A continuación, se añadieron 41,5 μ l de NaCNBH₃ 1 M en NaOH 0,01 M y la suspensión se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante mediante centrifugación de las perlas y se cuantificaron las proteínas no unidas mediante espectroscopía de UV. Las perlas se desactivaron con 500 μ l de Tris 1 M, pH 7,4 y 23 μ l de NaCNBH₃ 1 M en NaOH 0,01 M durante 30 min. a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron cuatro veces con NaCl 1 M y tres veces con MOPS 2 mM, NaCl 150 mM y NaN₃ al 0,02% (p/v), pH 7,3. Finalmente, se acoplaron 14 mg de Fc γ R11a(V158) por cada gramo de perlas POROS AL.

Cromatografía analítica utilizando Fc γ R11a(V158) inmovilizado sobre POROS AL. Se empaquetaron perlas POROS AL con Fc γ R11a(V158) en una columna Upchurch Scientific de 2x20 mm (volumen de columna: 60 μ l) que se montó en un sistema de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). Los tampones utilizados fueron: Tris 10 mM, glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8, para el equilibrado y lavado, o Tris 10 mM, glicina 50 mM y NaCl 100 mM, pH 3, para la elución. El caudal de bombeo del sistema de fijó en 0,5 ml/min. En el tiempo cero, se inyectó la preparación de anticuerpos (10 μ g de anticuerpos purificados con proteína A) utilizando el automuestreador y se lavó durante 2 min. y después se eluyó en un gradiente escalonado de 0,66 minutos de duración antes del reequilibrado durante 4,33 minutos. La duración total del ciclo fue de 7 minutos.

El cromatograma mostró dos picos: el pico no retenido y el pico eluido (figura 3). Se determinó el área de ambos picos mediante integración y se registró el porcentaje del pico eluido ("pico unido") respecto al área total.

Para la aplicación de dicho método con fines analíticos de alto rendimiento y de cuantificación del porcentaje de no fucosilación en una preparación de anticuerpos, en primer lugar se purificaron las muestras respecto del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A en el sistema de HPLC Agilent 1200 y se recolectaron en una placa de 96 pocillos. Las muestras se eluyeron en Tris 10 mM, glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3; se neutralizaron mediante la adición de Tris 2 M 1:40 (v/v), pH 8, y se reinyectaron en la columna de cromatografía de Fc γ R11a(V158). Debido a que la concentración de anticuerpo se conocía tras la cromatografía de proteína A, se adaptaron los volúmenes de inyección para inyectar 10 μ g de cada muestra en la columna de cromatografía de Fc γ R11a(V158).

Se mezclaron los anticuerpos de tipo salvaje y glucomanipulados en tampón de lavado con el fin de obtener diferentes proporciones de no fucosilación y se analizaron mediante cromatografía directamente en la columna de Fc γ R11a(V158). El porcentaje de no fucosilación determinado mediante EM MALDI-TOF y el porcentaje del "pico unido" en la columna de cromatografía de Fc γ R11a(V158) mostraban una correlación lineal (figura 4).

Se analizó el sobrenadante de cultivo celular de diferentes clones celulares que expresaban la IgG glucomanipulada "C" en paralelo mediante dos métodos diferentes: 1) Cromatografía de proteína A seguida de EM MALDI-TOF, y 2) cromatografía de proteína A con posterior cromatografía de Fc γ R11a(V158). Para dicho análisis de alto rendimiento se inyectaron 100 μ l de sobrenadante en la columna de cromatografía de proteína A; el eluido se neutralizó mediante la adición de Tris 2 M 1:40 (v/v), pH 8, y se digirió con PNGasa F para el análisis de EM MALDI-TOF de los carbohidratos o bien se inyectó en la columna de cromatografía de Fc γ R11a(V158). La ventaja de la combinación de cromatografía de proteína A y cromatografía de Fc γ R11a(V158) es que la placa de 96 pocillos que contiene las muestras eluida de la columna de proteína A puede utilizarse directamente después de la neutralización sin ninguna etapa adicional de intercambio de tampón o de pipeteado. El porcentaje del área del "pico unido" en la columna de Fc γ R11a(V158) se comparó con el porcentaje de no fucosilación obtenido mediante EM MALDI-TOF para los anticuerpos producidos por los diferentes clones celulares. Se obtuvo una clasificación similar con ambos métodos, demostrando que el método de la invención permite la identificación de los clones productos de los anticuerpos con el grado más alto de no fucosilación (figura 5).

Estos resultados demuestran que la cromatografía de FcγRIIIa puede utilizarse para el cribado de un sobrenadante de cultivo celular de alto rendimiento y para clasificar los anticuerpos producidos según su grado de no fucosilación.

5 Ejemplo 4

Cromatografía preparativa de FcγRIIIa

10 *Preparación de la matriz de afinidad.* Se acoplaron 30 mg de FcγRIIIa(V158) a sefarosa 4FF activada con NHS (GE Healthcare, Suecia). Brevemente, se intercambió FcγRIIIa(V158) en NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,2; se concentró hasta un volumen final de 2 ml y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente con 3 ml de perlas activadas con NHS que habían sido lavadas previamente con HCl frío 1 mM. Se eliminó el sobrenadante y las perlas se incubaron adicionalmente con Tris 0,1 M, pH 8,5, durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se empaquetaron las perlas en una columna Tricorn 5/150 vacía (GE Healthcare, Suecia) mediante flujo por gravedad, seguido de empaquetamiento a 1,2 ml/min. utilizando un Äkta Explorer 10 (GE Healthcare, Suecia). El volumen final de la columna era de 2,7 ml, a una longitud de columna de 14 cm. Se inmovilizaron 30 mg de FcγRIIIa(V158) humano.

20 *Separación preparativa de anticuerpos con diferentes grados de no fucosilación utilizando FcγRIIIa(V158) inmovilizado sobre NHS sefarosa 4FF.* Para la cromatografía, la columna se equilibró con 10 volúmenes de columna de Tris 20 mM, MOPS 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8, y se cargaron 3 mg de anticuerpo purificado (mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño) a un caudal de 0,1 ml/min. La columna se lavó con Tris 20 mM, MOPS 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8, durante 5 volúmenes de columna y se eluyeron las diferentes poblaciones de anticuerpos con tres etapas de pH, a 25 pH 4,6, pH 4,2 y pH 3 (figura 6). Los valores de pH deseados se obtuvieron mediante la mezcla de Tris 20 mM, MOPS 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8, y Tris 20 mM, MOPS 20 mM, citrato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, pH 3, en las proporciones apropiadas. Los picos se recolectaron, se concentraron y se inyectaron en una HPLC de proteína A para la purificación, o se purificaron por lotes con perlas con proteína A (necesarias para el análisis posterior de EM MALDI-TOF). Los anticuerpos se analizaron seguidamente para su composición de 30 carbohidratos, su unión a FcγRIIIa(V158) y su capacidad de inducir ADCC.

Ejemplo 5

Análisis de los anticuerpos separados

35 *Análisis de la composición de carbohidratos.* Para el análisis de EM MALDI-TOF de los oligosacáridos, estos se escindieron de los anticuerpos purificados con PNGasa F y Endo H (16). La cromatografía de FcγRIIIa(V158) separó las fracciones de anticuerpos con diferente contenido de glicanos no fucosilados. El primer pico, correspondiente a la fracción no retenida, presentaba la cantidad más baja de oligosacáridos no fucosilados, seguido de los picos dos y tres (ver las Tablas 2 y 3). Sin embargo, el análisis de EM MALDI-TOF reveló sólo la cantidad global de oligosacáridos no fucosilados en la preparación.

45 Con el fin de determinar la distribución de los residuos de fucosa en las dos cadenas pesadas de anticuerpo en el dominio Fc, las muestras se digirieron en un tratamiento combinado utilizando Endo S y Endo H (indicados anteriormente en la publicación de patente PCT nº WO 2011/039150, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad).

50 Para la IgG "A", los anticuerpos purificados se digirieron con plasmina, Endo H y Endo S para obtener fragmentos Fc que portaban únicamente el primer residuo de N-acetilglucosamina del núcleo oligosacárido y un residuo de fucosa en el caso de los carbohidratos fucosilados. Dichos fragmentos Fc se analizaron mediante EM-IEP y se determinó la distribución de la fucosa por cada fragmento Fc (Tabla 1).

55 Tabla 1. Contenido de carbohidratos no fucosilados en el pool de anticuerpos de la IgG "A" separada en tres fracciones mediante cromatografía de FcγRIIIa(V158). El grado de no fucosilación se determinó globalmente mediante EM MALDI-TOF tras el tratamiento de PNGasa F (media de 7 tandas) o la distribución de fucosa por cada Fc se determinó mediante EM-IEP tras la digestión con plasmina/Endo S/Endo H (grupo de 3 tandas).

Fracciones	No fucosilación promedio* (EM MALDI-TOF) n=7	Error estándar (EM MALDI-TOF) n=7	% Fc sin fucosa	% Fc con una fucosa	% Fc con dos fucosas	No fucosilación promedio* calculada [†]
IgG "A" pico 1	3,9 %	0,5%	1 %	1 %	98 %	1,5 %
IgG "A" pico 2	66,7%	1,5%	22 %	64 %	14 %	54 %
IgG "A" pico 3	91,9%	1,1%	61 %	39 %	0 %	80 %
IgG "A" inicio	58,5%	1,3%	30 %	41 %	29 %	50 %

* Porcentaje de glicanos que no presentan residuos de fucosa de entre todos los glicanos eluidos en el pico respectivo.

+ Valor calculado para la comparación de los resultados de MALDI TOF y EM-IEP. El valor se calculó añadiendo los porcentajes de glicanos que no presentaban fucosa en las tres glicofomas de Fc. Por ejemplo en el pico 2, 22/100 de los fragmentos Fc comprendía 2 glicanos no fucosilados (es decir 44/200 glicanos eran no fucosilados), 64/100 fragmentos Fc comprendía 1 glicano no fucosilado (es decir 64/200 glocamps eran no fucosilados) y 14/100 fragmentos Fc no comprendía ningún glicano no fucosilado (es decir 0/200 glicanos eran no fucosilados), resultando en un total de $44+64+0=108/200=54\%$ de glicanos no fucosilados eluidos en el pico 2.

Para la IgG "B", los anticuerpos purificados se digirieron con Endo H (QA Bio) y Endo S (Genovis) con el fin de obtener IgG completas con glicanos que consistían del primer residuo de N-acetilglucosamina del núcleo oligosacárido con o sin fucosa. Estas muestras se analizaron mediante EM-IEP y se determinó la distribución de la fucosa por cada anticuerpo (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de carbohidratos no fucosilados en el pool de anticuerpos de la IgG "B" separada en tres fracciones mediante cromatografía de FcγRIIIa(V158). El grado de no fucosilación se determinó globalmente mediante EM MALDI-TOF tras el tratamiento de PNGasa F (promedio de 2 tandas) o la distribución de fucosa por cada IgG se determinó mediante EM-IEP tras la digestión con Endo S/Endo H (promedio de 2 tandas).

Fracciones	No fucosilación promedio (EM MALDI-TOF) n=2	Error estándar (EM MALDI-TOF) n=2	% Fc sin fucosa	% Fc con una fucosa	% Fc con dos fucosas	No fucosilación promedio* calculada ⁺
IgG "B" pico 1	7,2 %	0,7%	4,5 %	4,5 %	88 %	6,8 %
IgG "B" pico 2	64,7%	0,5%	20,5 %	68,5 %	11 %	54,8 %
IgG "B" pico 3	96,8%	0,3%	76,5 %	18,5 %	5 %	85,8 %
IgG "B" inicio	71,5%	0%	43 %	40 %	17 %	63 %

* Porcentaje de glicanos que no presentan residuos de fucosa de entre todos los glicanos eluidos en el pico respectivo.

+ Valor calculado para la comparación de los resultados de MALDI TOF y EM-IEP. El valor se calculó añadiendo los porcentajes de glicanos que no presentaban fucosa en las tres glicofomas de Fc. Por ejemplo en el pico 2, 20,5/100 de los fragmentos Fc comprendía 2 glicanos no fucosilados (es decir 41/200 glicanos eran no fucosilados), 68,5/100 fragmentos Fc comprendía 1 glicano no fucosilado (es decir 68,5/200 glocamps eran no fucosilados) y 11/100 fragmentos Fc no comprendía ningún glicano no fucosilado (es decir 0/200 glicanos eran no fucosilados), resultando en un total de $41+68,5+0=109,5/200=54,8\%$ de glicanos no fucosilados eluyeron en el pico 2.

Para tanto IgG "A" como "B" el pico 1 contenía mayoritariamente anticuerpos que portaban azúcares fucosilados en ambas cadenas pesadas en el dominio Fc (es decir, anticuerpos totalmente fucosilados), mientras que el pico 2 contenía mayoritariamente anticuerpos con un carbohidrato fucosilado y un carbohidrato no fucosilado, y la población del pico 3 contenía mayoritariamente anticuerpos completamente no fucosilados. El porcentaje de anticuerpos que eran totalmente no fucosilados aparentemente se subestimó ligeramente mediante el método de EM-IEP, ya que el valor calculado (ver la última columna en las Tablas 1 y 2, anteriormente) generalmente era inferior que el resultado de la EM MALDI-TOF.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) Se sometieron a ensayo diferentes fracciones para su capacidad de inducir ADCC. Se recolectaron células Raji (para el ensayo de ADCC de la IgG "A") o A549 (para el ensayo de ADCC de la IgG "B") (células adherentes con tripsina/EDTA), se lavaron y se marcaron durante 30 minutos a 37°C con calceína (Invitrogen). Tras 30 minutos, las células se lavaron 3 veces con medio AIM V y se resuspendieron en medio AIM V. Se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo a una densidad de 30.000 células/pocillo. Se añadieron las diluciones de anticuerpos respectivas y se incubaron durante 10 minutos antes del contacto con células efectoras humanas (NK92 1708 clon LC3 E11, que son células NK92 transfectadas con FcγRIIIa(V158)). Las células efectoras y diana a una proporción 3:1 se coincubaron durante 4 horas a 37°C. Se midió la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche Applied Science, nº de cat. 11 644 793 001). Se determinó la retención de calceína mediante lisado de las células remanentes con tampón de borato (borato 5 mM, Triton X-100 al 0,1% (v/v)) seguido de la medición de la fluorescencia de la calceína. Para el cálculo de la eliminación dependiente de anticuerpos, se fijó la liberación espontánea (sólo células diana y efectoras sin anticuerpo) en 0% de eliminación y la máxima liberación (células diana y Triton X-100 al 2% (v/v)) se fijó en 100% de eliminación.

Sólo el primer pico (que contiene anticuerpos con carbohidratos fucosilados en ambas cadenas pesadas) presentaba una capacidad reducida de inducir ADCC, comparable a la de la IgG de tipo salvaje (figura 7). Tanto el pico 2 como el pico 3 presentaba una capacidad comparable de inducir ADCC, mostrando que sólo un glicano no fucosilado por cada anticuerpo resultaba suficiente para proporcionar una capacidad de ADCC superior a una IgG.

Unión de FcγRIIIa mediante resonancia del plasmón superficial Se determinó la resonancia del plasmón superficial a 25°C. Se inmovilizó el antígeno humano "B" mediante acoplamiento de aminos sobre un chip CM5 siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, Suecia). Se capturaron las fracciones de IgG durante 90 s a 100 nm y a 10 μl/min. Se pasó el FcγRIIIa(V158) humano a un intervalo de concentración de 1,95 a 500 nM a un caudal de 50 μl/min. a través de las celdas de flujo durante 120 s. Se monitorizó la disociación durante 220 s. Se regeneró la superficie con dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2, durante 60 s antes de la siguiente inyección. Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una celda de flujo de referencia. Las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir con $RI=0$ y $R_{max}=local$ (software de evaluación BIACORE® T100, versión 1.1.1) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} .

Los resultados obtenidos mediante resonancia del plasmón superficial concordaban con los resultados del ensayo de ADCC (Tabla 3 y figura 8). El primer pico, así como la IgG "B" de tipo salvaje presentaban una K_D de aproximadamente 50 nM con tasas on y off muy rápidas, mientras que los picos 2 y 3, así como la IgG "B" glucomanipulada presentaban una K_D de aproximadamente 3 nM para la unión a FcγRIIIa(V158) y una tasa off mucho más lenta. La IgG del pico 3 presentaba la afinidad más alta para FcγRIIIa(V158).

Tabla 3. Afinidad entre FcγRIIIa(V158) e IgG "B". K_D obtenida mediante resonancia del plasmón superficial a 25°C. Los tres picos del pool de anticuerpos de IgG "B" separada mediante cromatografía de FcγRIIIa(V158) y el material de partida se capturaron sobre antígeno inmovilizado y se utilizó FcγRIIIa(V158) como analito. Ajuste: cinético (unión 1:1, $RI=0$, $R_{max}=local$) o estado de equilibrio.

	No fucosilación (EM MALDI-TOF)	K_D (nM)	Modelo	Sensograma figura 8
IgG "B" pico 1	7,2%	59	Estado de equilibrio	A
IgG "B" pico 2	64,7%	3.7	Cinético	B
IgG "B" pico 3	96,8%	1.8	Cinético	C
IgG "B" inicio (glucomanipulada)	71,5%	2.5	Cinético	D
IgG "B" tipo salvaje	8%	71	Estado de equilibrio	E

Conjuntamente, los ejemplos muestran que la cromatografía de FcγRIIIa(V158) permite separar anticuerpos según su contenido de carbohidratos no fucosilados en su dominio Fc. El método puede aplicarse al cribado del sobrenadante a alto rendimiento (en combinación con cromatografía de proteína A) para identificar los clones productores de anticuerpos con un grado elevado de no fucosilación o para separar fracciones de una IgG según su contenido de fucosa para la caracterización adicional. El análisis de las poblaciones de anticuerpos separadas con la cromatografía de FcγRIIIa(V158) demostró por primera vez que las IgG con mayoritariamente uno o dos carbohidratos no fucosilados en sus dominios Fc se comportan igual en términos de ADCC y que, por lo tanto, no existe necesidad de que una población de anticuerpos 100% no fucosilada consiga una función efectora incrementada.

Referencias

- Wright A, Morrison SL (1997) Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. Trends Biotechnol. 15(1):26-32
- Krapp S et al (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. J Mol Biol. 325(5):979-89
- Raju TS (2008) Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. Curr Opin Immunol. 20(4):471-8
- Jefferis R (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. Trends Pharmacol Sci. 30(7):356-62
- Hodoniczky J, Zheng YZ, James DC (2005) Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. Biotechnol Prog. 21(6):1644-52
- Malhotra R et al (1995) Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nat Med. 3:237-43
- Shields RL et al (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. J Biol Chem. 277(30):26733-40
- Umana P et al (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. Nat Biotechnol. 17(2):176-80
- Ferrara C et al (2006) Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous β(1, 4)-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α-mannosidase II. Biotechnol Bioeng. 93(5):851-61

10. Kanda Y et al (2006) Comparison of biological activity among non-fucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*. 17(1):104-18
- 5 11. Deisenhofer J et al (1978) Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 359(8):975-85
12. Groneborn AM and Clore GM (1993) Identification of the contact surface of a streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment. *J Mol Biol*. 233(3):331-5
- 10 13. Graille M et al (2001) Complex between *Peptostreptococcus magnus* protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. *Structure*. 9(8):679-87
14. Drake P et al (2011) A lectin affinity workflow targeting glycosite-specific, cancer-related carbohydrate structures in trypsin-digested human plasma. *Anal Biochem*. 408:71-85.
- 15 15. Cho W et al (2008) Use of glycan targeting antibodies to identify cancer-associated glycoproteins in plasma of breast cancer patients. *Anal Chem*. 80:5286-5292.
16. Schuster M et al (2005) Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res*. 65(17):7934-41.
17. Koene HR et al (1997) FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 90:1109-1114.
- 20 18. Papac DI et al (1996) Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 68:3215-3223.

Aunque la invención anteriormente proporcionada ha sido descrita en detalle a título ilustrativo y ejemplar con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativas del alcance de la invención.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Roche Glycart AG
- 30 <120> Método de separación para anticuerpos fucosilados
- <130> 30672
- <150> EP 11185798.3
- 35 <151> 2011-10-19
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 222
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> proteína de fusión FcγRIIIa(V158)-(Lys)₆-(His)₆ soluble
- 50 <400> 1

ES 2 619 677 T3

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
 210 215 220

5 <210> 2
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> proteína de fusión FcyRIIIa(V158)-(Lys)₆-(His)₆, ADN

ES 2 619 677 T3

<400> 2

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgoggact	60
gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg ggcctcaat ggtacagggg gctcgagaag	120
gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg	180
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca	240
gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccoggtg	300
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag	360
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca	420
tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca	480
aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat	540
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaaggtt tggcagtgtc aaccatctca	600
tcattctttc cacctgggta ccaaggcaaa aagaaaaaga aaaagggcca ccaccatcac	660
catcactga	669

REIVINDICACIONES

1. Método para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto una población de anticuerpos con FcγRIIIa V158 inmovilizado sobre un soporte,
 - b) eluir los anticuerpos que no se unen específicamente a dicho receptor de Fc, y
 - c) eluir los anticuerpos unidos específicamente a dicho receptor de Fc, en el que la elución de la etapa c) comprende poner en contacto el soporte con una solución tamponada que interrumpe la unión de anticuerpos al receptor de Fc y en el que la solución tamponada presenta un valor de pH comprendido en el intervalo de entre 3 y 5.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la afinidad de unión del receptor de Fc para los anticuerpos depende del grado de fucosilación de los anticuerpos.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los anticuerpos son anticuerpos IgG.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los anticuerpos son glucomanipulados para presentar una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de los mismos en comparación con un anticuerpo no glucomanipulado correspondiente.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de los anticuerpos ha sido purificada.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de los anticuerpos ha sido purificada por afinidad utilizando proteína A o proteína G.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte es una matriz de polímero.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte está comprendido en una columna de cromatografía.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de:
 - b1) lavado del soporte.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la elución de la etapa b) comprende la separación de los anticuerpos que quedan libres en la población de anticuerpos tras la puesta en contacto en la etapa b).
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los anticuerpos eluidos en la etapa b) son anticuerpos totalmente fucosilados.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la elución de la etapa c) se lleva a cabo a diferentes valores de pH.
13. Método según la reivindicación 12, en el que los valores de pH comprenden 4,6 y 4,2.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los anticuerpos eluidos en la etapa c) son anticuerpos parcial y/o totalmente no fucosilados.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método está destinado a fines analíticos.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método está destinado a fines preparativos.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de:
 - d) recolectar los anticuerpos eluidos de la etapa b) y/o de la etapa c)
18. Método según la reivindicación 17, que comprende además la etapa de:
 - e) utilización de los anticuerpos recolectados para fines experimentales o terapéuticos

19. Utilización del receptor de Fc llamado FcγRIIIa V158 inmovilizado sobre un soporte en un método para la separación de anticuerpos que presentan diferentes grados de fucosilación.

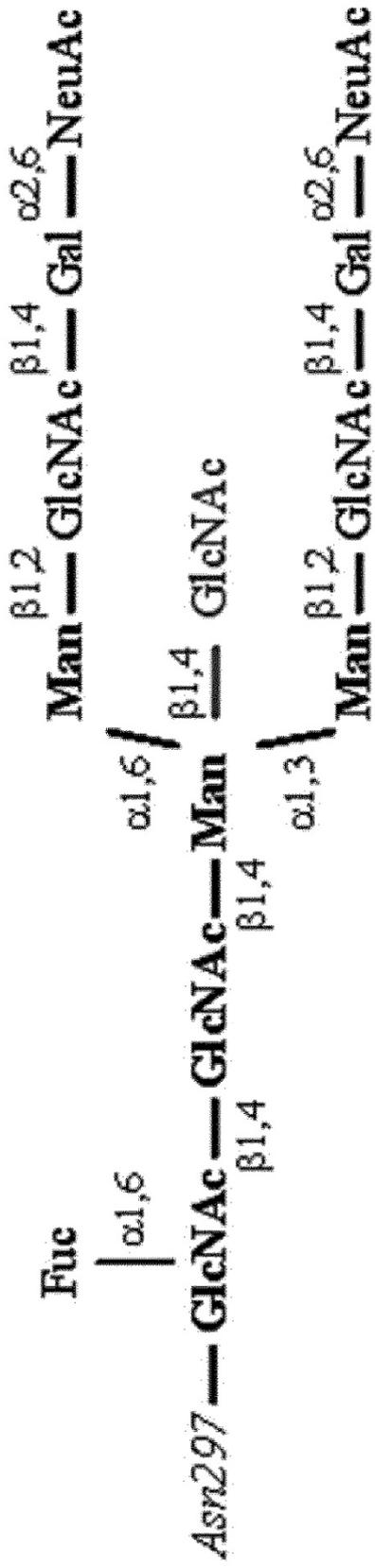


Figura 1

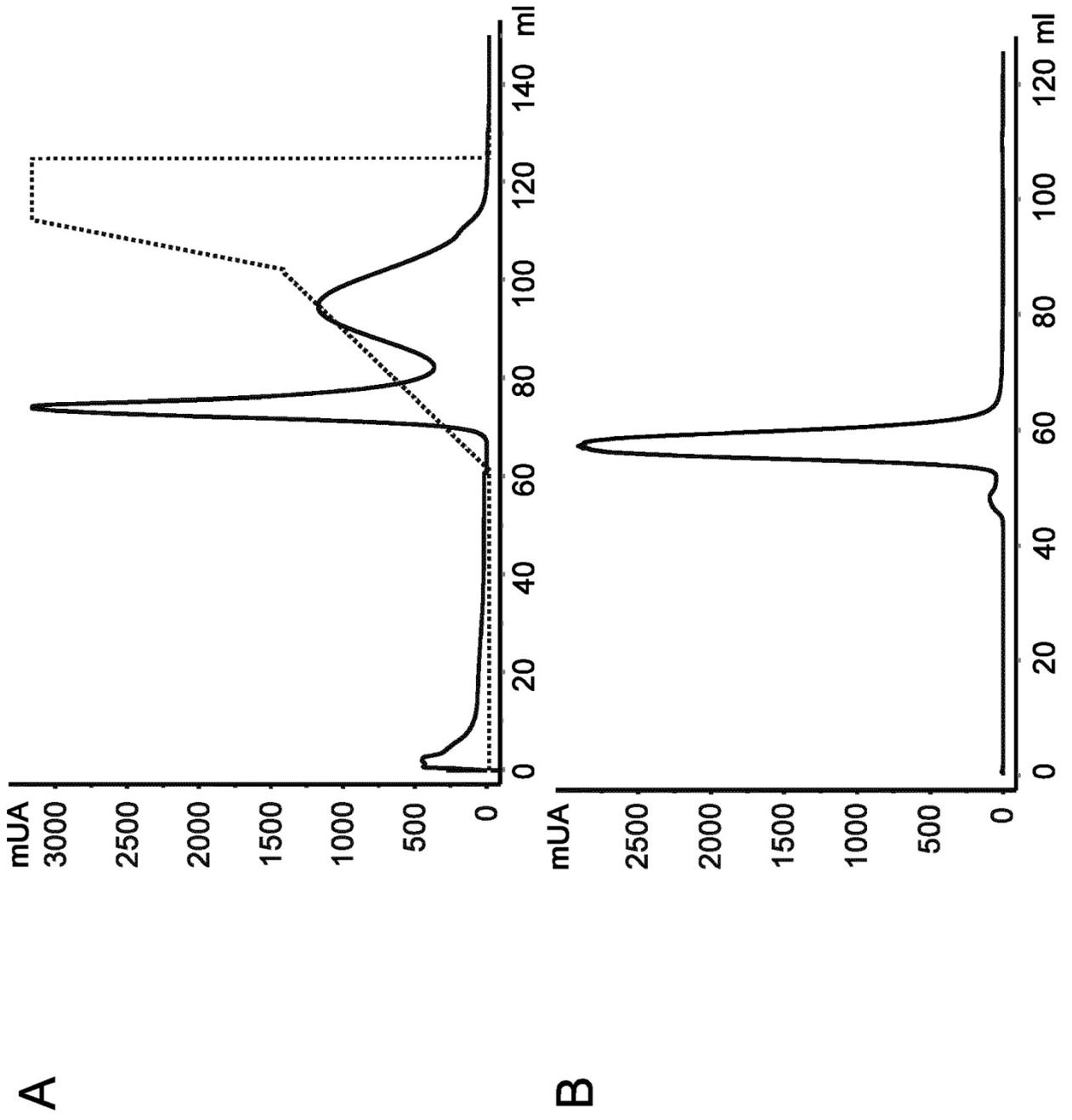


Figura 2

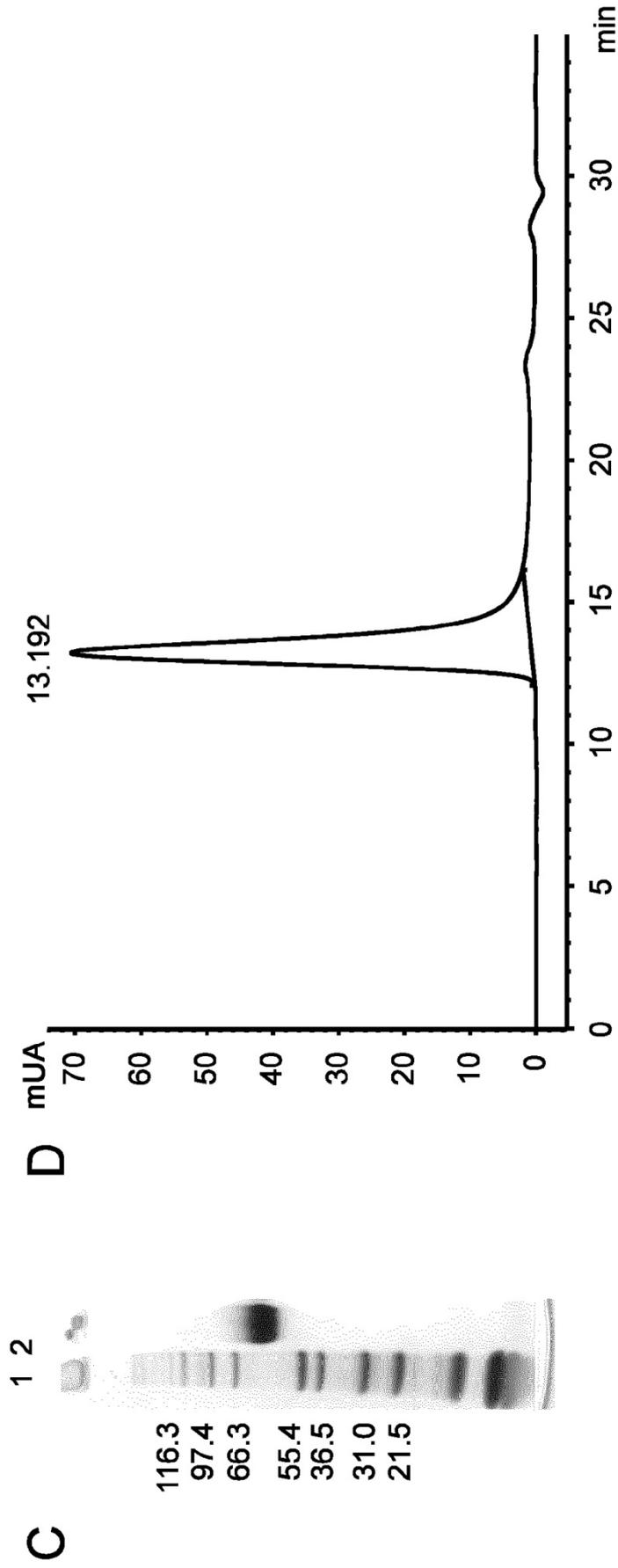


Figura 2

Figura 3

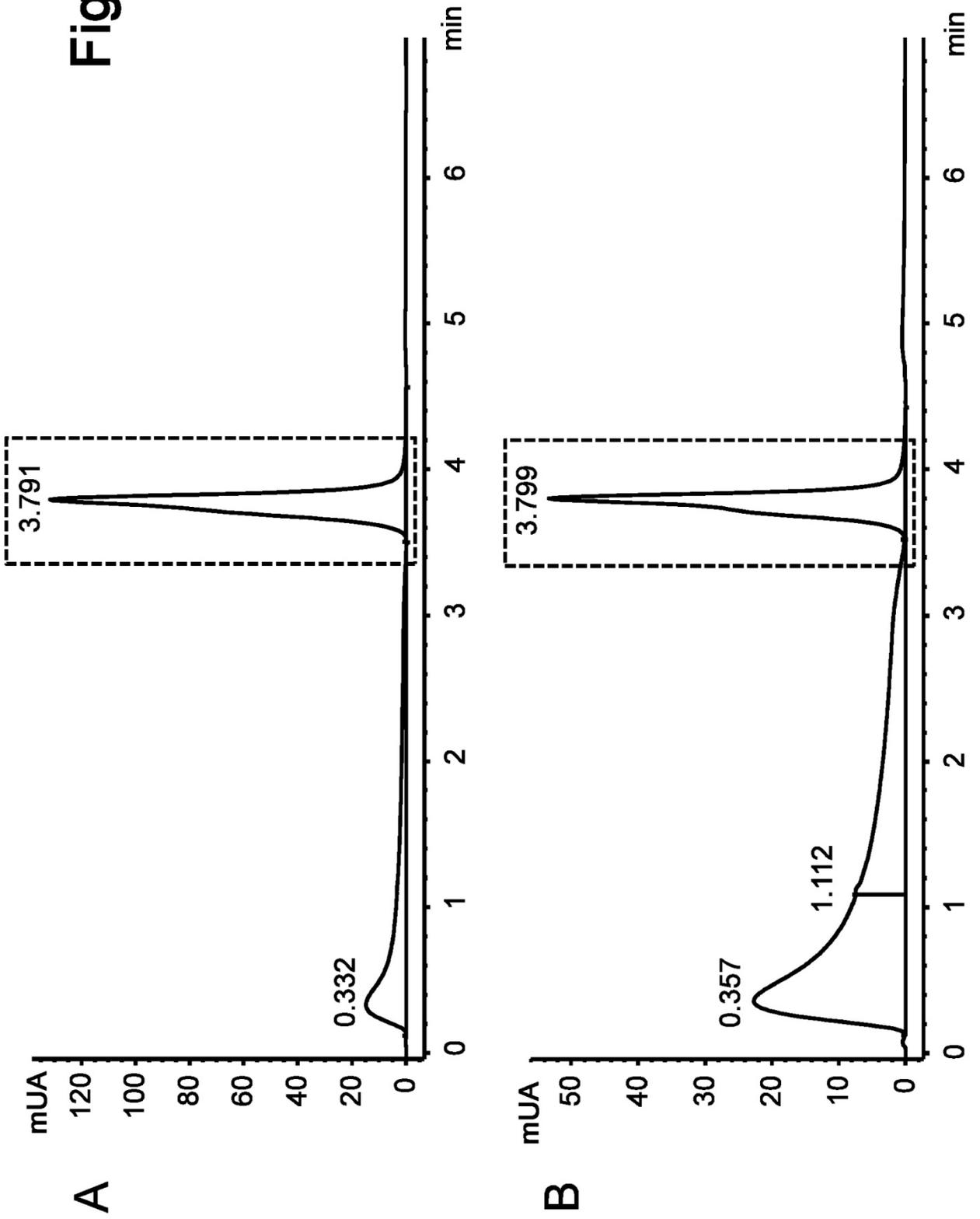
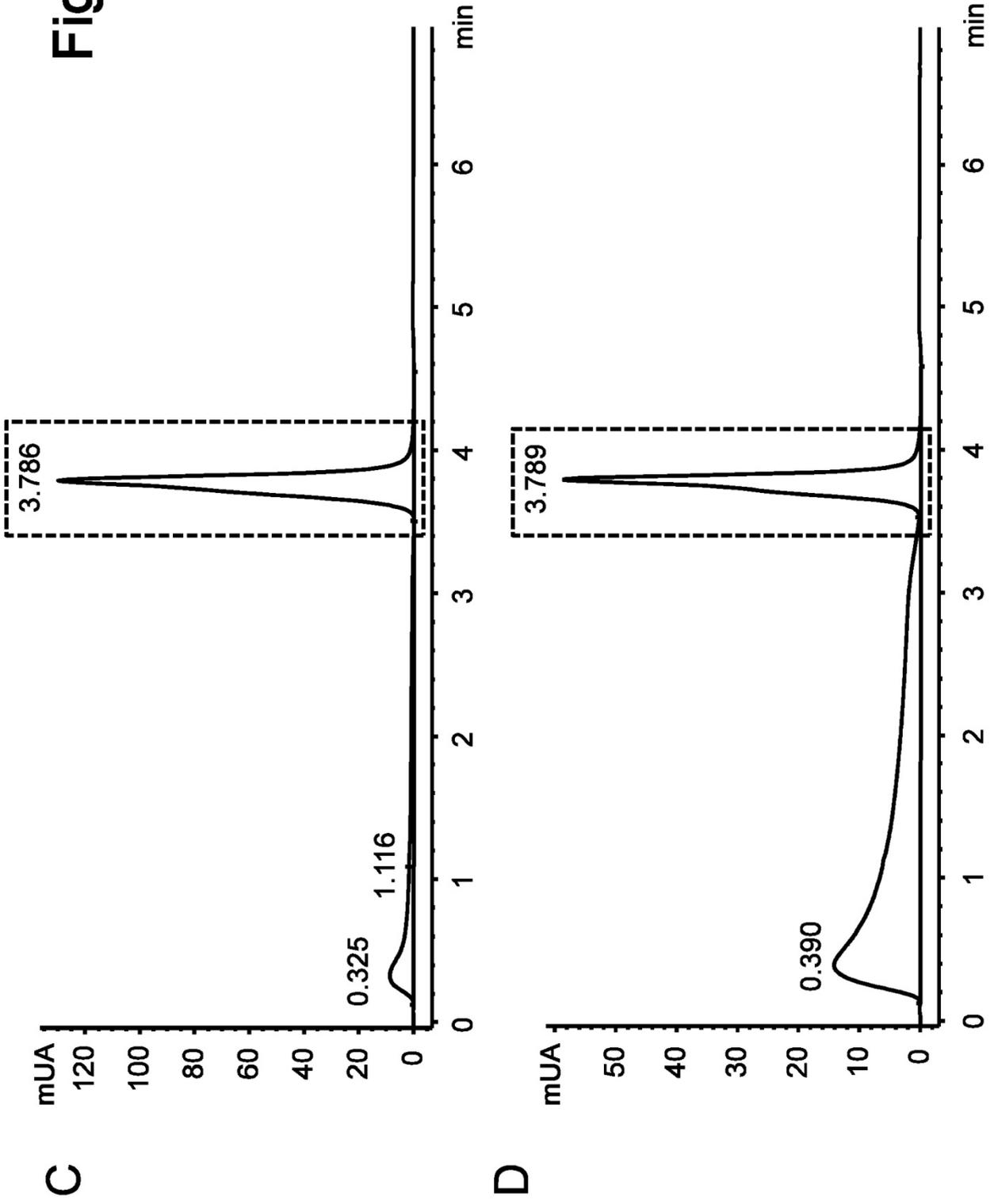


Figura 3



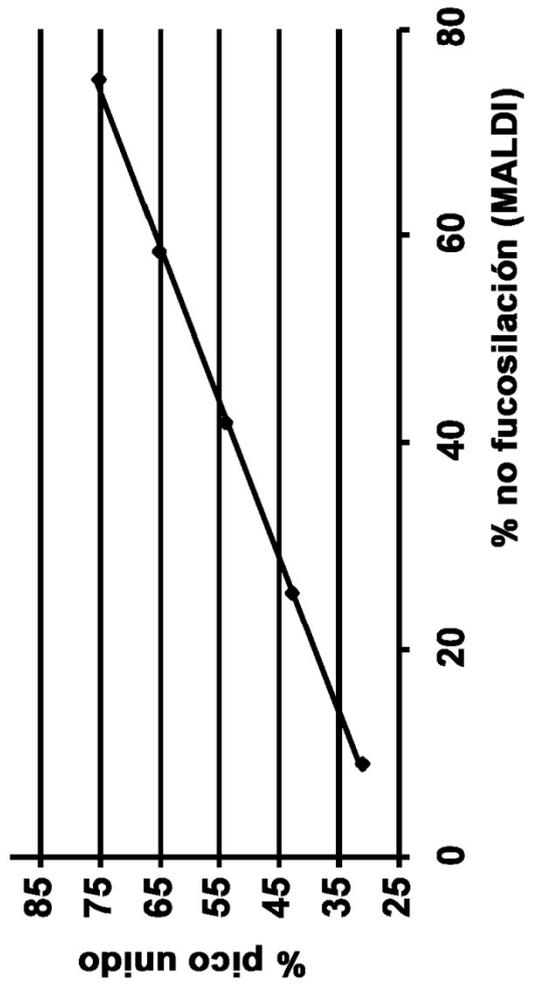
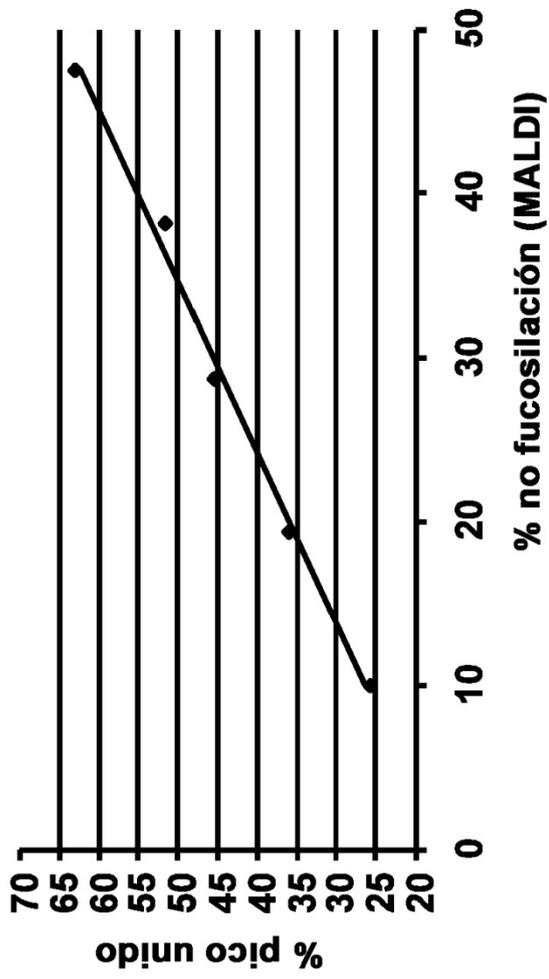


Figura 4

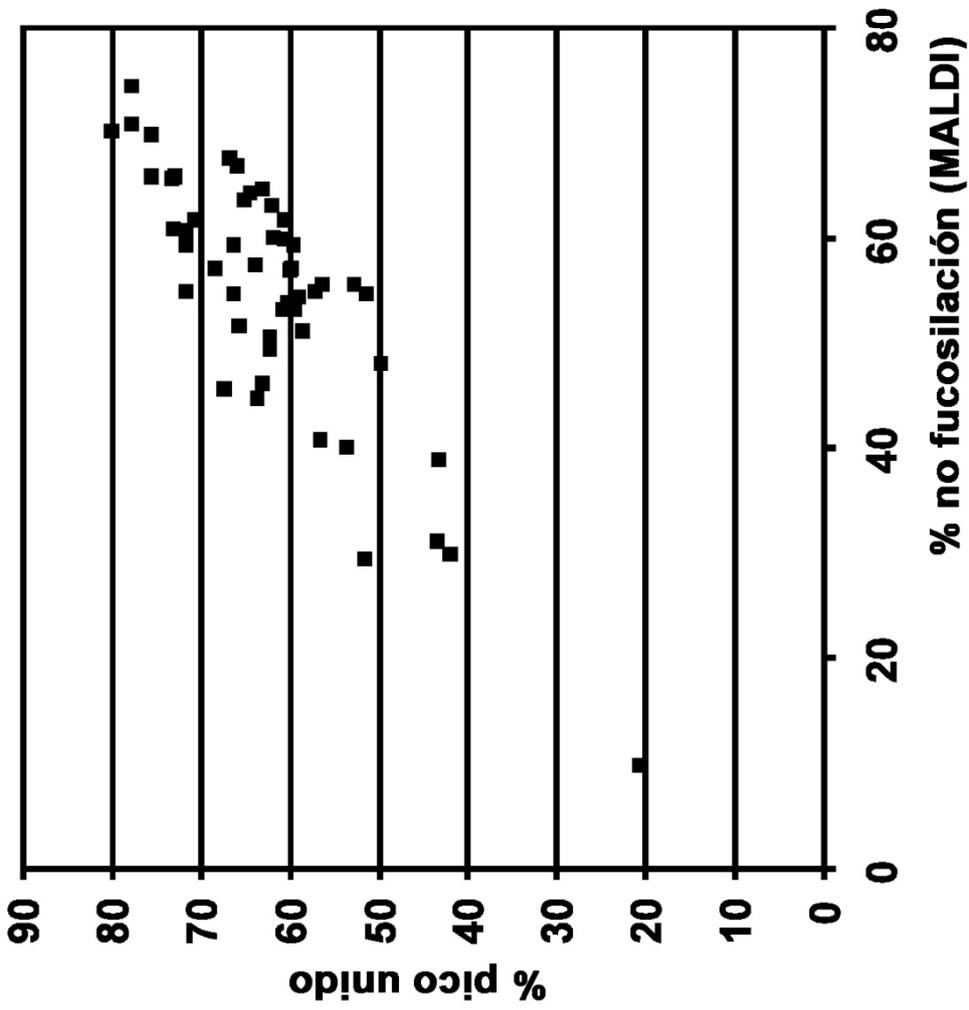


Figura 5

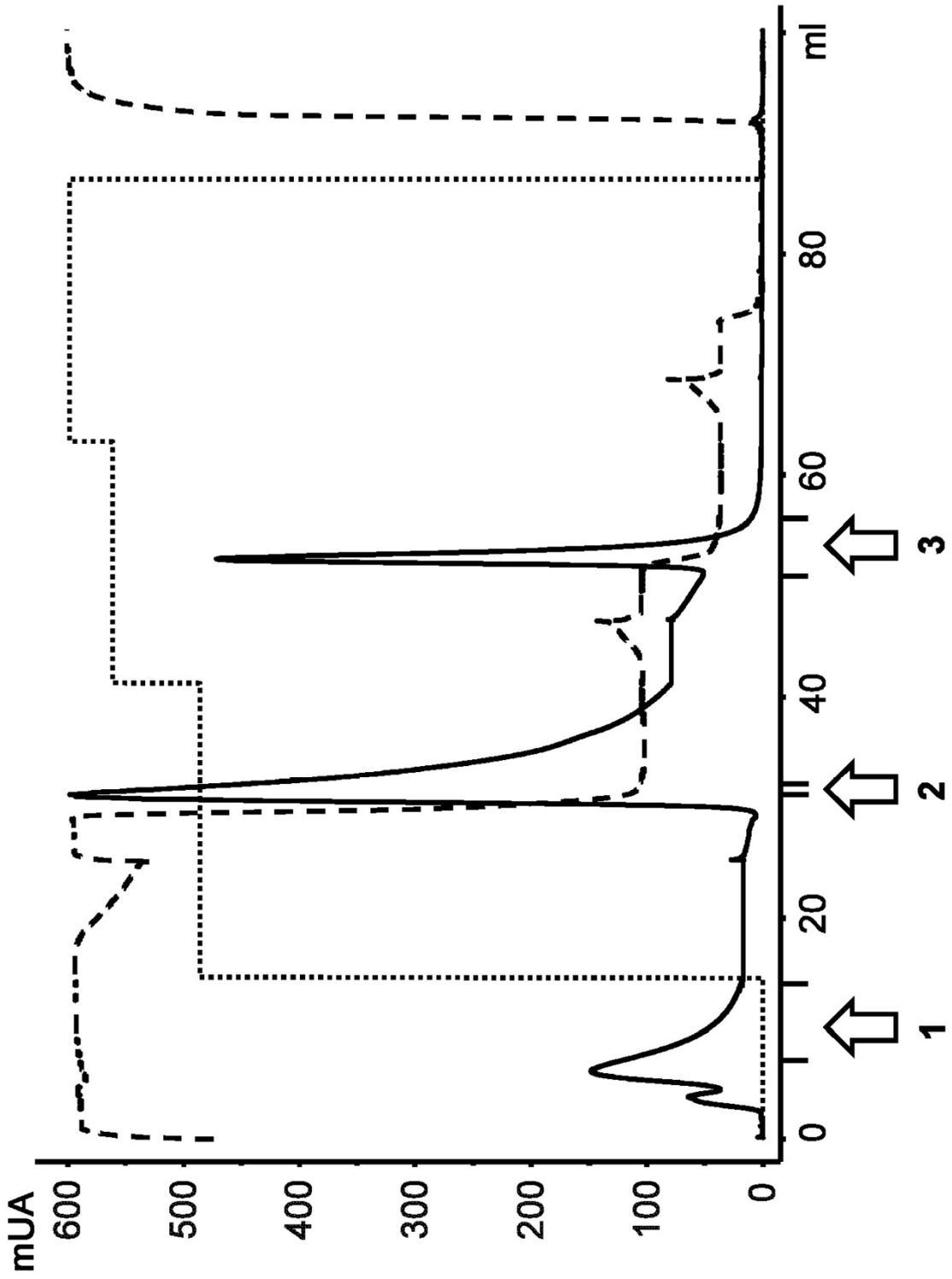


Figura 6

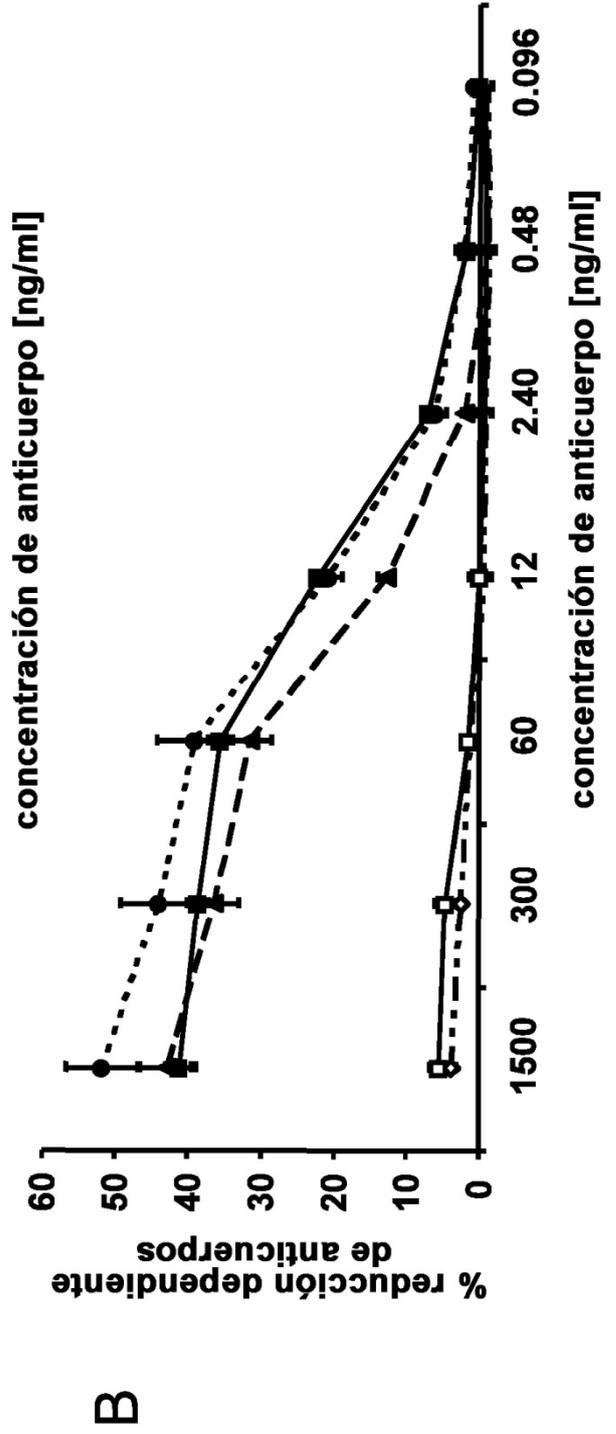
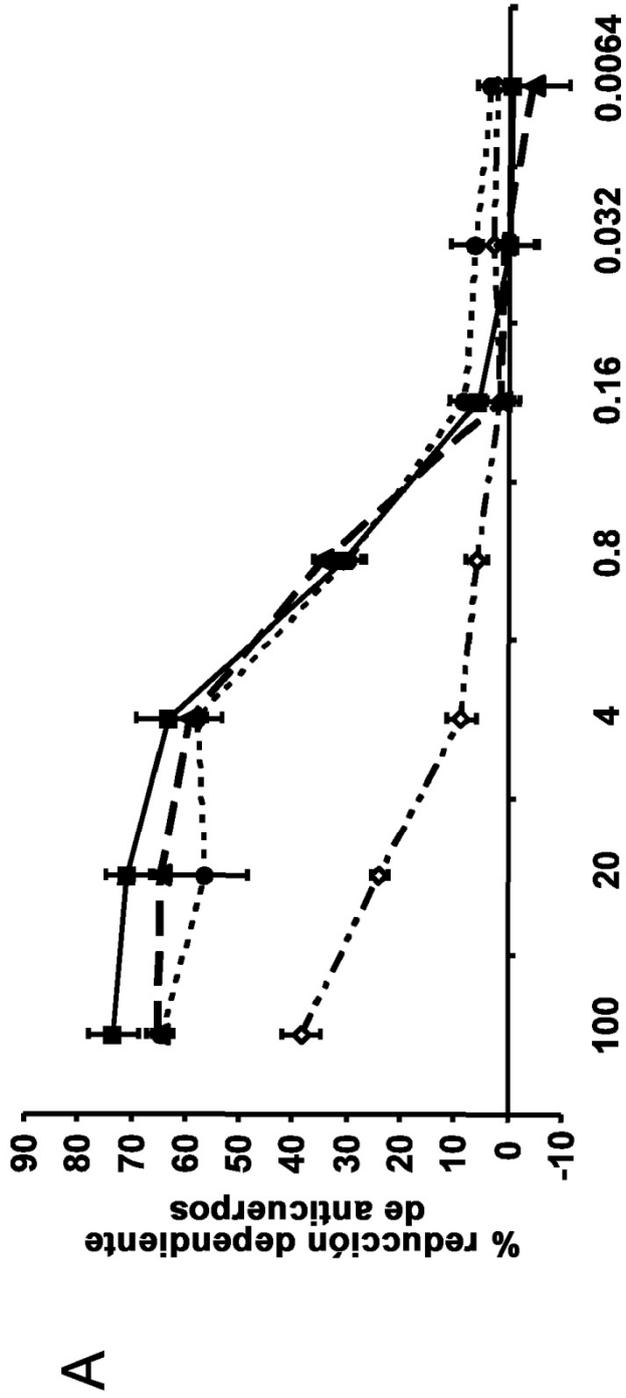


Figura 7

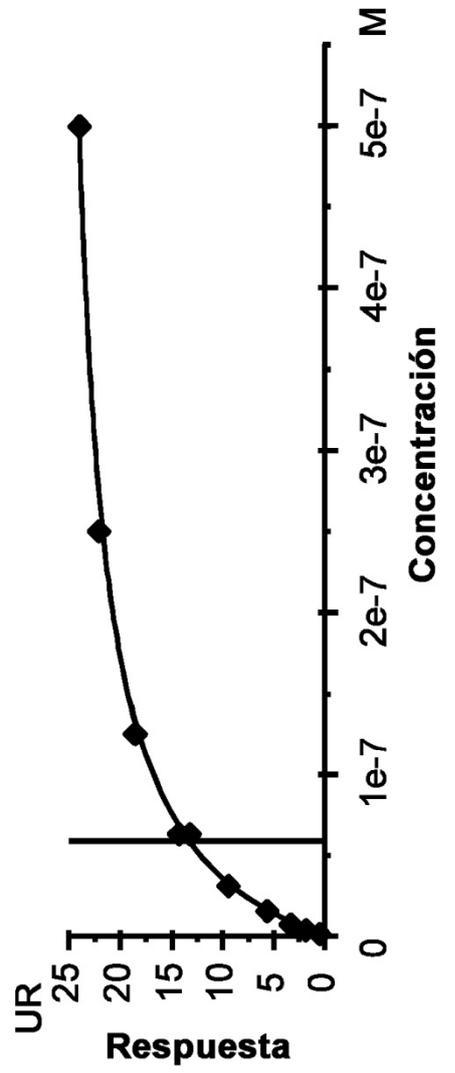
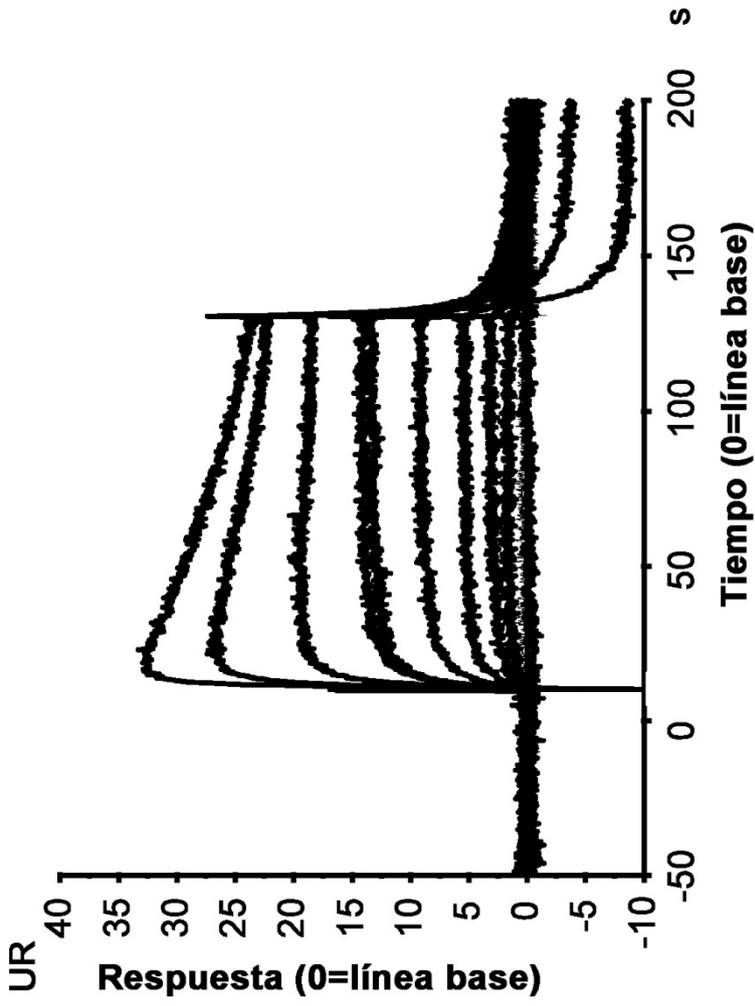


Figura 8

Figura 8

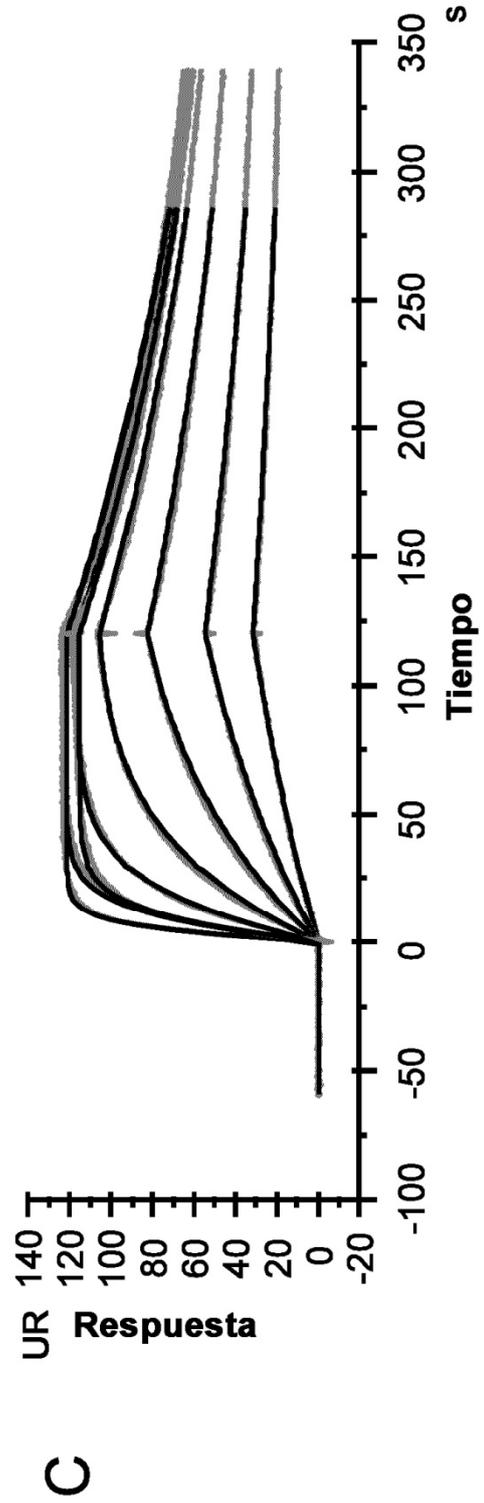
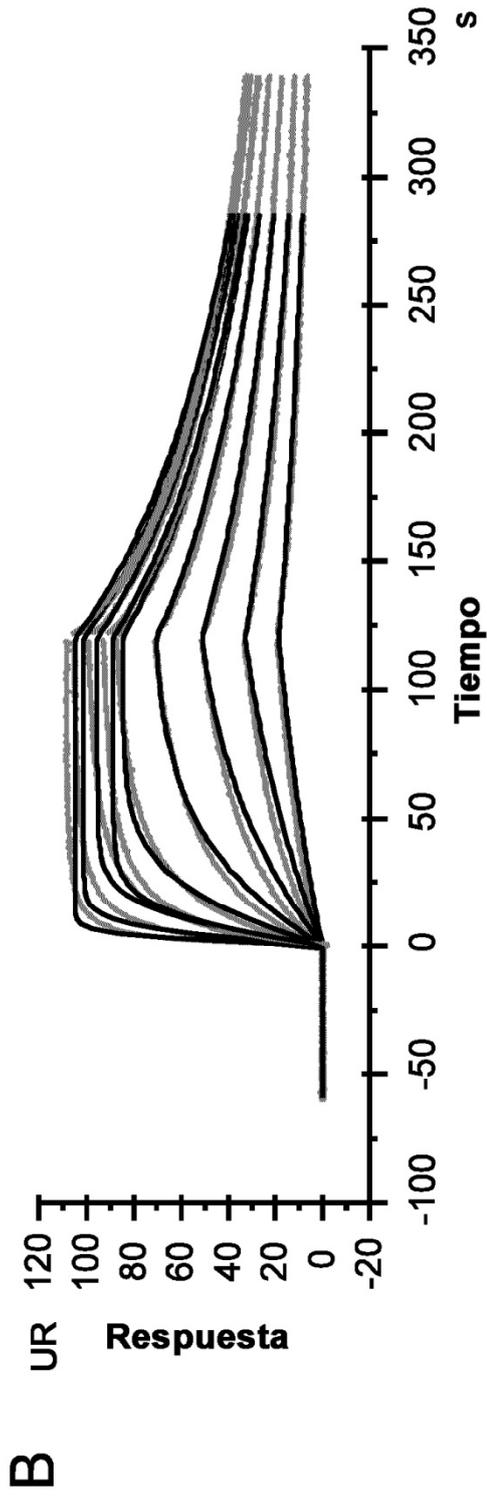


Figura 8

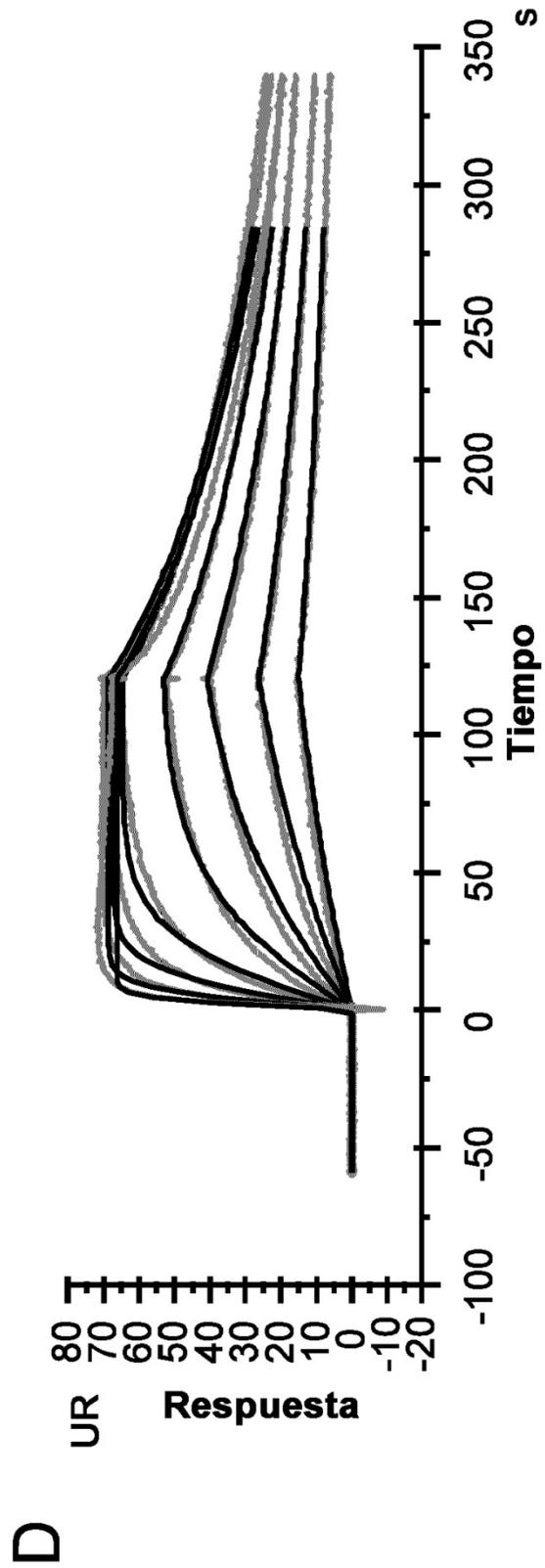
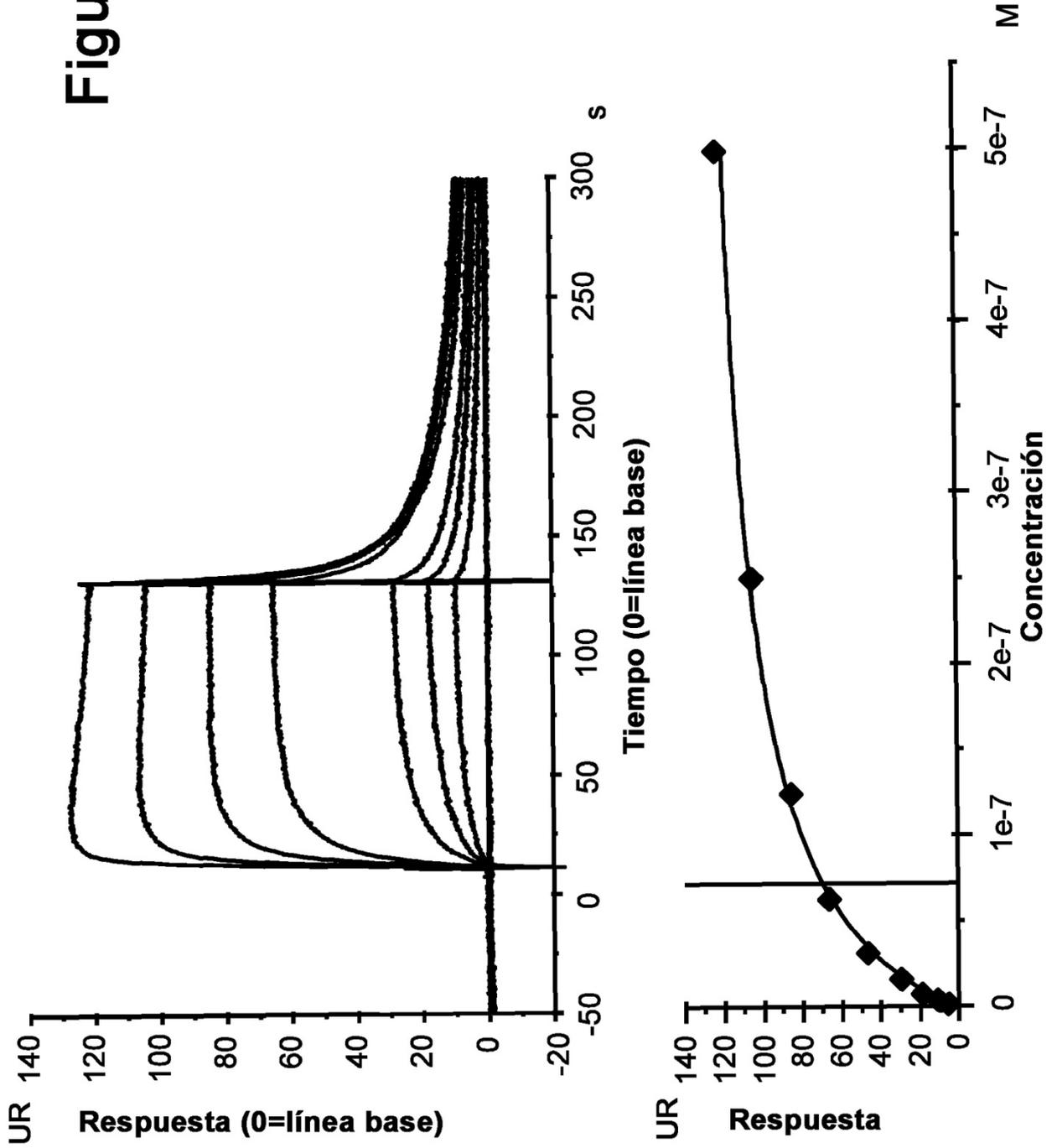


Figura 8



E