

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 985**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2021 PCT/US2021/062843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2022 WO22125922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2021 E 21854830 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 4260071**

54 Título: **Procedimientos para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de polipéptidos**

30 Prioridad:

**11.12.2020 US 202063124320 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.06.2025**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.00%)  
1 DNA Way  
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**YANG, YI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 3 028 985 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

Procedimientos para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de polipéptidos

5

### Campo de la invención

La presente descripción se refiere a procedimientos para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de polipéptidos. Específicamente, la presente descripción se refiere a procedimientos de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) estereoselectiva que logran la separación simultánea y la cuantificación relativa de la glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de polipéptidos.

10

### Antecedentes

15

La uronidación es una modificación de polipéptidos postraduccional que resulta de la fijación covalente de un ácido urónico a un grupo amina primaria, tal como la cadena lateral de un residuo de lisina. Existen cinco ácidos urónicos naturales: ácido glucurónico, ácido idurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico y ácido gularónico (figura 1). En polipéptidos recombinantes producidos por células de mamífero, por ejemplo, células CHO, así como células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, se puede producir la modificación de aminas primarias por ácido glucurónico, ácido idurónico, ácido galacturónico. Por el contrario, no se esperan modificaciones por ácido manurónico y ácido gularónico en polipéptidos expresados de forma recombinante, puesto que estos dos ácidos urónicos se encuentran en algas pardas o en determinados tipos de bacterias que no se usan comúnmente para la producción de polipéptidos recombinantes.

20

25

La modificación de polipéptidos por ácido glucurónico, ácido idurónico o ácido galacturónico tiene el potencial de tener un impacto en la seguridad y/o eficacia de dichos productos expresados de forma recombinante. Por ejemplo, la modificación de los residuos de lisina dentro de las regiones determinantes de la complementariedad de los fármacos de anticuerpos monoclonales por ácido glucurónico podría interferir en la unión a diana y, de este modo, provocar una pérdida en la potencia del anticuerpo. De forma alternativa, la modificación de los residuos de lisina dentro de las regiones determinantes de la complementariedad por ácido idurónico tiene el potencial de provocar una unión distinta de a la diana debido a la flexibilidad conformacional única del ácido idurónico. Además, debido a que no se ha observado la modificación de los residuos de lisina por ácido idurónico o ácido galacturónico en polipéptidos humanos endógenos, la iduronidación y galacturonidación de polipéptidos expresados de forma recombinante potencialmente podrían formar un neoepítipo, lo que puede conllevar un riesgo inmunogénico. Para garantizar la seguridad y eficacia de los polipéptidos expresados de forma recombinante, es importante determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación.

30

35

Jonas Nilsson *et al.*, (Journal of the American society for mass spectrometry, vol. 28, n.º 2, páginas 229 - 241, 21 de noviembre de 2016) describen un procedimiento de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) que permite la caracterización de glucopéptidos que se originan a partir de hidrolizados de proteasas de glucoproteínas.

40

El documento US 2019/234964 proporciona un procedimiento para identificar la glucuronilación de una proteína desglucosilando la proteína y tratando la proteína desglucosilada con una enzima y sometiendo los péptidos resultantes a un análisis por cromatografía de líquidos de fase inversa/espectroscopia de masas.

45

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de una población de polipéptidos que comprende:

50

a) poner en contacto la población de polipéptidos con una proteasa para generar péptidos;

55

b) poner en contacto los péptidos con un soporte cromatográfico que comprende una fase estacionaria hidrófoba y una carga superficial positiva;

c) poner en contacto el soporte cromatográfico con un gradiente de fase móvil de ácido débil para separar los péptidos;

60

d) analizar los péptidos separados para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de los péptidos.

En determinados modos de realización, la proteasa es tripsina, lys-C, Glu-C o Asp-N.

65

En determinados modos de realización, el soporte cromatográfico comprende un material de soporte con un

modificador de superficie cargado positivamente.

En determinados modos de realización, la fase estacionaria hidrófoba está enlazada al modificador de superficie.

5 En determinados modos de realización, la fase estacionaria hidrófoba comprende un grupo funcional alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

En determinados modos de realización, la fase estacionaria hidrófoba comprende un grupo funcional C18.

10 En determinados modos de realización, los péptidos separados se analizan usando espectrometría de masas.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la identificación de péptidos glucuronidados, iduronidados y/o galacturonidados.

15 En determinados modos de realización, los péptidos se identifican por su respectivo tiempo de retención cromatográfica y espectros de masas.

20 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación que se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de líquidos correspondientes a los péptidos separados como se supervisa por absorbancia UV.

25 En determinados modos de realización, la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de iones extraídos del análisis por espectrometría de masas.

En determinados modos de realización, el ácido débil empleado en el contexto de los procedimientos descritos en el presente documento es ácido fórmico o ácido acético.

30 En determinados modos de realización, la fase móvil ácida empleada en los procedimientos descritos en el presente documento está a un pH donde más de un 50 % de los restos ácido carboxílico asociados con la glucuronidación, iduronidación o galacturonidación están en un estado desprotonado.

35 En determinados modos de realización, el gradiente de fase móvil de ácido débil usado en el contexto de los procedimientos descritos en el presente documento tiene un pH > 3.

En determinados modos de realización, el gradiente de fase móvil de ácido débil tiene un valor de pKa de aproximadamente 4,5.

40 En determinados modos de realización, la espectrometría de masas empleada en el contexto de los procedimientos descritos en el presente documento es ionización por electronebulización-espectrometría de masas en tándem (ESI-EM/EM).

45 En determinados modos de realización, el polipéptido analizado por los procedimientos descritos en el presente documento es un anticuerpo.

### Breve descripción de los dibujos

50 La **figura 1** representa las estructuras de los ácidos urónicos naturales.

La **figura 2** representa cromatogramas de iones extraídos que muestran la separación de péptidos glucuronidados (glua) e iduronidados (idoa). El anticuerpo A se modificó a través de glucuronidación/iduronidación forzada. A continuación, las muestras se digirieron con tripsina y analizaron por CL-EM/EM usando una columna CSH C18. Los péptidos IdoA y GluA se eluyeron a los 15,07 y 15,38 minutos, respectivamente.

55 La **figura 3** representa cromatogramas de iones extraídos del péptido galacturonidado (glaa). El anticuerpo A se modificó a través de galacturonidación forzada. A continuación, las muestras se digirieron con tripsina y analizaron por CL-EM/EM usando una columna CSH™ C18. El péptido GlaA se eluyó a los 15,16 minutos.

60 La **figura 4** representa la falta de separación estereoselectiva de péptidos candidatos en una columna BEH™ C18.

### Descripción detallada

65 No se pretende que la siguiente descripción detallada, que se da a modo de ejemplo, limite la materia objeto divulgada actualmente a modos de realización específicos descritos y se puede entender junto con los dibujos adjuntos.

La presente descripción se refiere a procedimientos para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de polipéptidos. Específicamente, la presente descripción se refiere a procedimientos de CL-EM estereoselectiva que logran la separación simultánea y la cuantificación relativa de la glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de polipéptidos.

## 1. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica usada en el presente documento tengan los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se debe interpretar necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que, en general, se entiende en la técnica.

Se pretende que los términos "comprende(n)", "incluye(n)", "que tiene", "tiene", "puede", "contiene(n)" y variantes de los mismos, como se usa en el presente documento, sean frases, términos o palabras de transición abiertos que no excluyan la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. La presente divulgación también contempla otros modos de realización "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" los modos de realización o elementos presentados en el presente documento, independientemente de si se exponen explícitamente o no.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por un experto en la técnica, que dependerá, en parte, de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 3 o más de 3 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. De forma alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta un 20 %, preferentemente hasta un 10 %, más preferentemente hasta un 5 % y más preferentemente todavía hasta un 1 % de un valor dado. De forma alternativa, en particular, con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y, más preferentemente, dentro de 2 veces, de un valor.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere, en general, a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Los polipéptidos pueden ser homólogos a la célula huésped o, preferentemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, extraños, a la célula huésped que se utiliza, tal como una proteína humana producida por una célula de ovario de hámster chino, o un polipéptido de levadura producido por una célula de mamífero. En determinados modos de realización, se usan polipéptidos de mamífero (polipéptidos que se derivaron originalmente de un organismo mamífero), más preferentemente aquellos que se secretan directamente en el medio.

El término "proteína" pretende hacer referencia a una secuencia de aminoácidos para la que la longitud de la cadena sea suficiente para producir los mayores niveles de estructura terciaria y/o cuaternaria. Esto es para distinguirse de los "péptidos" u otros fármacos de pequeño peso molecular que no tengan dicha estructura. Típicamente, la proteína en el presente documento tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferentemente de al menos aproximadamente 20 kD. Los ejemplos de proteínas englobadas dentro de la definición en el presente documento incluyen todas las proteínas de mamífero, en particular, proteínas terapéuticas y de diagnóstico, tales como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico y, en general, proteínas que contienen uno o más enlaces disulfuro, incluyendo polipéptidos de múltiples cadenas que comprenden uno o más enlaces disulfuro inter- y/o intracatenarios.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos (por ejemplo, anticuerpos que consisten en una secuencia de cadena pesada única y una secuencia de cadena ligera única, incluyendo multímeros de dichos emparejamientos), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

## 2. Procedimientos para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de un polipéptido

En determinados modos de realización, los procedimientos para la distribución relativa y/o identificación de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de polipéptidos descritos en el presente documento comprenden: a) poner en contacto un polipéptido con una proteasa para generar péptidos; b) poner en contacto los péptidos con un soporte cromatográfico que comprende una fase estacionaria hidrófoba y una carga superficial positiva; c) poner en contacto el soporte cromatográfico con un gradiente de fase móvil de ácido débil para separar

los péptidos; y d) analizar los péptidos separados para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de los péptidos.

Los procedimientos explicados en el presente documento permiten la determinación directa de la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de polipéptidos. Estos procedimientos contrastan con otros enfoques para investigar la glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de polipéptidos. Por ejemplo, los enfoques que miden el nivel de ácido glucurónico en líquidos de cultivo celular no necesariamente se correlacionan con el nivel de glucuronidación de los polipéptidos producida por dichos cultivos, y mucho menos proporcionan alguna información en referencia a la distribución o identidad de los aminoácidos modificados de dichos polipéptidos. El enfoque descrito actualmente también difiere de los procedimientos que requieren la liberación de ácidos urónicos de los péptidos en el procedimiento de detección, por ejemplo, Lin *et al.*, Eur. J Biochem, 106:341-351 (1980) y Spiro, JBC, 252(15): 5424-5430 (1977), ya que dichos enfoques no permiten la identificación directa de la distribución o localización de los aminoácidos modificados.

En determinados modos de realización, la proteasa es una aspártico, cisteína, metalo-, serina o treonina proteasa. En la técnica son conocidas proteasas ejemplares útiles en relación con la presente divulgación, por ejemplo, Verhamme *et al.* Proteases: Pivot Points in Functional Proteomics, Methods Mol Biol. 2019; 1871: 313-392, que se incorpora por referencia en su totalidad. En determinados modos de realización, la proteasa es tripsina. En determinados modos de realización, la proteasa es lys-C. En determinados modos de realización, la proteasa es Glu-C. En determinados modos de realización, la proteasa es Asp-N.

En determinados modos de realización, el soporte cromatográfico comprende un material de soporte con un modificador de superficie cargado positivamente. En determinados modos de realización, el modificador de superficie se puede fijar a un material base de soporte cromatográfico por medio de derivatización, recubrimiento y/o reticulación, confiriendo, de este modo, el carácter químico del modificador de superficie al material base del soporte cromatográfico. Los modificadores de superficie ejemplares se identifican en la patente de EE. UU. n.º 7.223.473, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. En determinados modos de realización, el modificador de superficie puede ser un organotrihalosilano, tal como octiltriclorosilano u octadeciltriclorosilano. En determinados modos de realización, el soporte cromatográfico comprende una fase estacionaria hidrófoba. En determinados modos de realización, la fase estacionaria hidrófoba está enlazada, covalente o no covalentemente, al modificador de superficie. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el modificador de superficie puede comprender uno o más grupos funcionales alquilo, alqueno, alquino, arilo como fase estacionaria hidrófoba. En determinados modos de realización, los grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, tal como octilo (C<sub>8</sub>), octadecilo (C<sub>18</sub>) y triacontilo (C<sub>30</sub>); alcarilo, por ejemplo, grupos fenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. El soporte cromatográfico puede ser una fase estacionaria híbrida con superficie cargada (CSH™). El soporte cromatográfico puede ser una fase estacionaria CSH™ C18.

En determinados modos de realización, la fase móvil ácida está a un pH donde más de un 50 % de los restos ácido carboxílico asociados con la glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación están en un estado desprotonado. En determinados modos de realización, el ácido débil es ácido fórmico o ácido acético. En determinados modos de realización, el gradiente de fase móvil de ácido débil tiene un pH>3. En determinados modos de realización, el gradiente de fase móvil de ácido débil tiene un valor de pKa de aproximadamente 4,5.

En determinados modos de realización, los péptidos separados se analizan usando espectrometría de masas. En determinados modos de realización, la espectrometría de masas es ionización por electronebulización-espectrometría de masas en tándem (ESI-EM/EM).

En determinados modos de realización, los procedimientos de la materia objeto divulgada actualmente comprenden además la identificación de péptidos glucuronidados, iduronidados y/o galacturonidados. En determinados modos de realización, los péptidos se identifican por su respectivo tiempo de retención cromatográfica y/o espectros de masas. En determinados modos de realización, la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de líquidos correspondientes a los péptidos separados como se supervisa por absorbancia UV. En determinados modos de realización, la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de iones extraídos del análisis por espectrometría de masas.

En determinados modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o triespecífico.

## Ejemplos

**Ejemplo 1: ensayo para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de polipéptidos**

5 Los polipéptidos del anticuerpo A se digirieron usando una proteasa (tal como tripsina, lys-C, Glu-C o Asp-N). Los péptidos resultantes se separaron usando una columna CSH™ C18. La separación estereoselectiva se basó en una interacción carga-carga entre la carga negativa del ácido urónico y la carga superficial positiva de las fases estacionarias y una interacción hidrófoba entre los péptidos uronidados y la fase estacionaria hidrófoba. Se empleó un gradiente de fase móvil usando ácidos débiles (tal como ácido fórmico o acético, pero no ácido trifluoroacético) en las fases móviles para lograr la separación de péptidos glucuronidados, iduronidados y galacturonidados. Se seleccionaron los ácidos débiles, puesto que, a pH > 3, la mayoría de los grupos carboxílicos (pKa ≈ 4,5) del resto ácido urónico están cargados negativamente, lo que promueve una interacción carga-carga estereoselectiva entre el resto ácido urónico y la fase estacionaria cargada positivamente.

10 Los polipéptidos del anticuerpo A se digirieron usando una proteasa (tal como tripsina, lys-C, Glu-C o Asp-N). Los péptidos resultantes se analizaron usando una columna BEH™ C18, no estando cargada positivamente su fase estacionaria. Se empleó un gradiente de fase móvil usando ácido trifluoroacético en las fases móviles (pH < 3), donde el ácido trifluoroacético es un reactivo de par iónico usado comúnmente para mejorar la conformación de pico para una separación cromatográfica mejorada. Como se muestra en la figura 4, la separación estereoselectiva no se puede lograr en la columna BEH™ C18.

15 Los péptidos eluidos se analizaron posteriormente por ESI-EM/EM. La identidad de los péptidos glucuronidados, iduronidados y galacturonidados se confirmó por su respectivo tiempo de retención a partir de la separación cromatográfica (figuras 2 y 3) y por sus espectros de masas obtenidos del análisis por ESI-EM/EM. La distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación se determinó integrando los respectivos picos en los cromatogramas de líquidos (supervisados por absorbancia UV) o en los cromatogramas de iones extraídos (en base a la masa molecular, figuras 2 y 3).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación de una población de polipéptidos, comprendiendo el procedimiento:
- 5 a) poner en contacto la población de polipéptidos con una proteasa para generar péptidos;
- b) poner en contacto los péptidos con un soporte cromatográfico que comprende una fase estacionaria hidrófoba y una carga superficial positiva;
- 10 c) poner en contacto el soporte cromatográfico con un gradiente de fase móvil de ácido débil para separar los péptidos;
- d) analizar los péptidos separados para determinar la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y/o galacturonidación de los péptidos.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteasa es tripsina, lys-C, Glu-C o Asp-N.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte cromatográfico comprende un material de soporte con un modificador de superficie cargado positivamente.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la fase estacionaria hidrófoba está enlazada al modificador de superficie.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la fase estacionaria hidrófoba comprende un grupo funcional alquilo, alquenoilo, alquinoilo o arilo.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la fase estacionaria hidrófoba comprende un grupo funcional C18.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los péptidos separados se analizan usando espectrometría de masas.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la identificación de péptidos glucuronidados, iduronidados y galacturonidados.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que los péptidos se identifican por su respectivo tiempo de retención cromatográfica y espectros de masas.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de líquidos correspondientes a los péptidos separados como se supervisa por absorbancia UV.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la distribución relativa de glucuronidación, iduronidación y galacturonidación se determina integrando los respectivos picos de los cromatogramas de iones extraídos del análisis por espectrometría de masas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido débil es ácido fórmico o ácido acético.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fase móvil ácida está a un pH donde más de un 50 % de los restos ácido carboxílico asociados con la glucuronidación, iduronidación o galacturonidación están en un estado desprotonado.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gradiente de fase móvil de ácido débil tiene un pH>3.
- 55 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gradiente de fase móvil de ácido débil tiene un valor de pKa de aproximadamente 4,5.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la espectrometría de masas es ionización por electronebulización-espectrometría de masas en tándem (ESI-EM/EM).
- 60 17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un anticuerpo.

Figura 1.

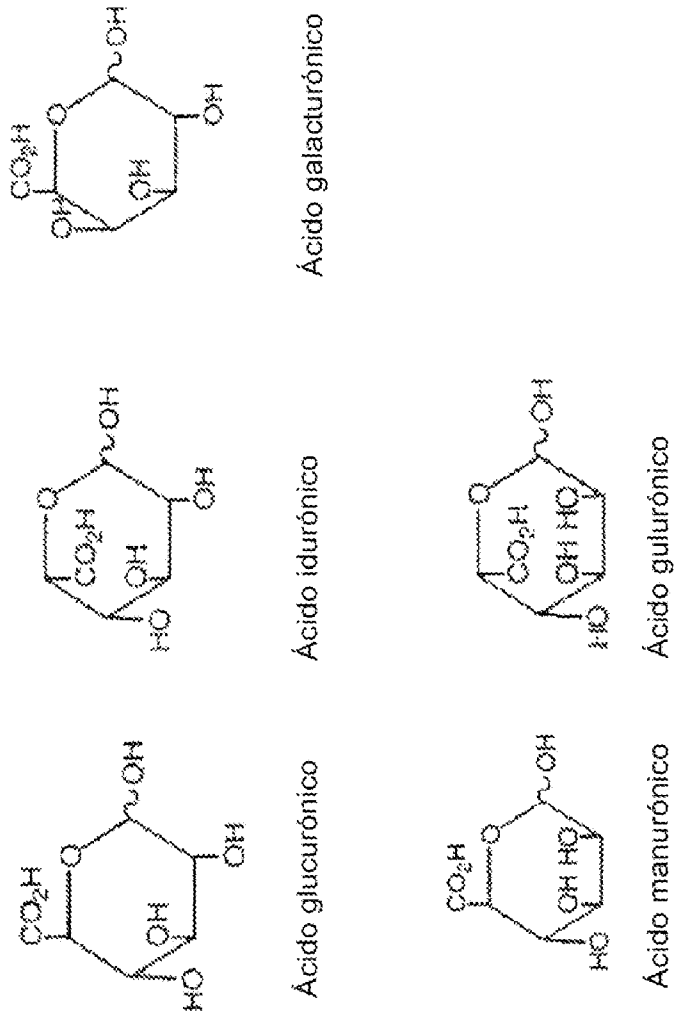
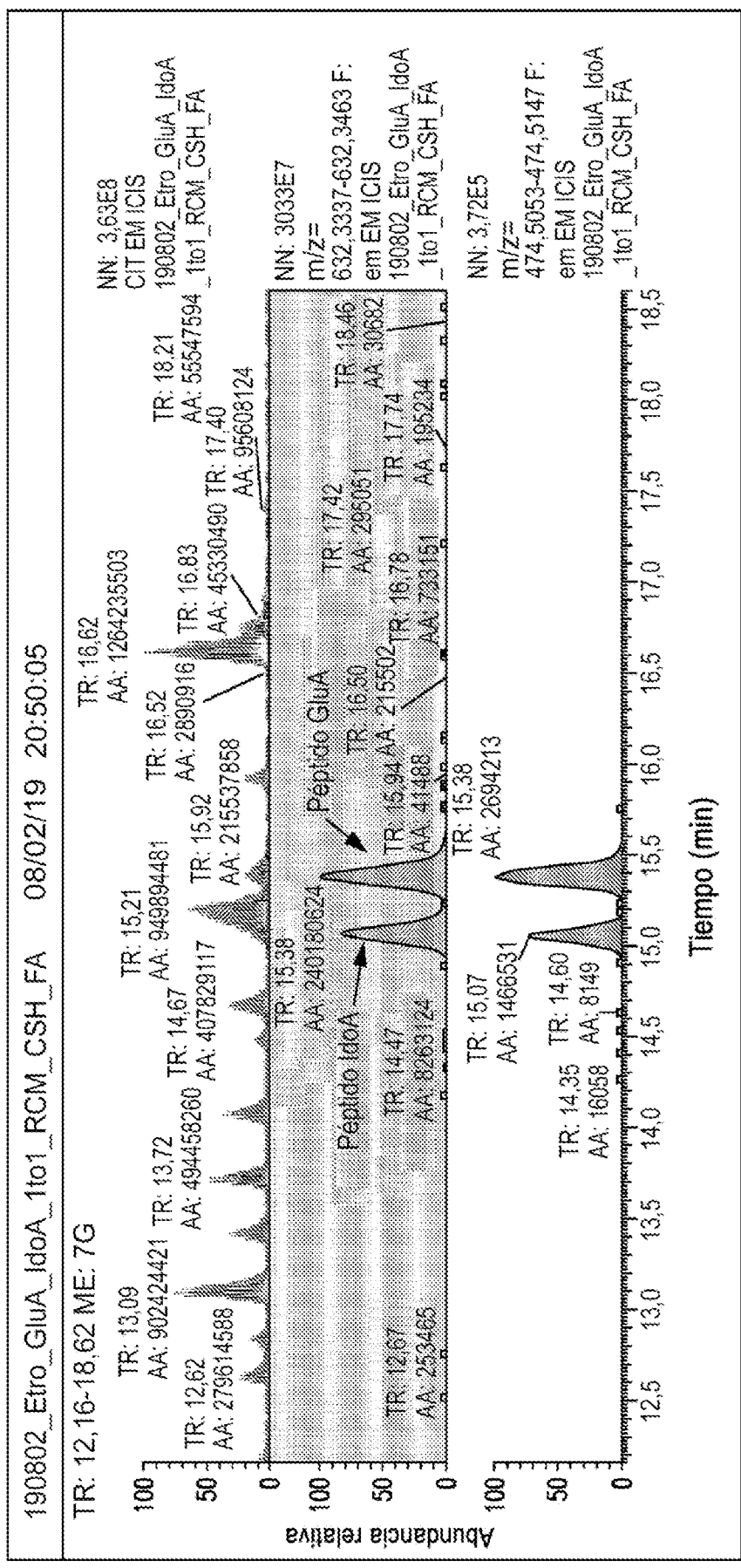


Figura 2.



Péptido GlaA

Figura 3.

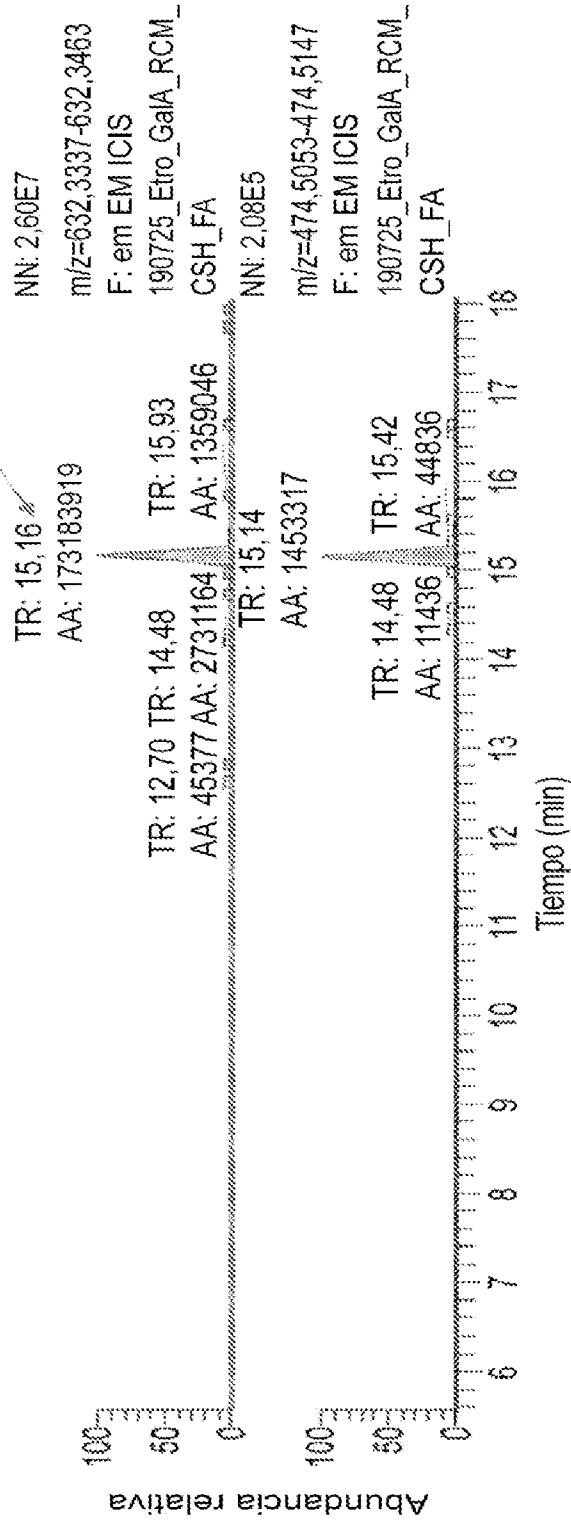


Figura 4.

