(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 172**

(51) Int. Cl.:
***G01N 33/68*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06806361 .9**
(96) Fecha de presentación : **18.10.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1943524**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

(54) Título: **Procedimiento para caracterizar la glicosilación de sialoglicoproteínas mediante un número de isoformas I.**

(30) Prioridad: **21.10.2005 DE 10 2005 050 580**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**10.11.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**10.11.2009**

(73) Titular/es: **Peter Hermentin**
**Feuerdornweg 8**
**35041 Marburg, DE**

(72) Inventor/es: **Hermentin, Peter**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para caracterizar la glicosilación de sialoglicoproteínas mediante un número de isoformas I.

El objeto de la presente invención es un procedimiento para caracterizar la calidad de sialoglicoproteínas, así como un procedimiento *in vitro* para determinar la biodisponibilidad de sialoglicoproteínas mediante la electroforesis capilar de zona (ECZ) que se basa en el "número de isoformas", a continuación llamado I, y puede utilizarse tanto para glicoproteínas endógenas como también glicoproteínas exógenas.

Las glicoproteínas exógenas son en este contexto, por ejemplo, glicoproteínas recombinantes terapéuticas obtenidas a partir de células de mamíferos, como por ejemplo eritropoyetina, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica, activador tisular del plasminógeno o antitrombina III.

Las glicoproteínas endógenas son en este contexto humanas o no humanas, por ejemplo, bovinas, glicoproteínas del suero, como por ejemplo, $\alpha_1$-glicoproteína ácida humana, transferrina humana o fetuína bovina.

La investigación, el desarrollo y la producción de glicoproteínas terapéuticas, así como su autorización oficial o clínica, requiere una costosa analítica en cuanto a la semivida *in vivo*, seguridad biológica, definición de productos y consistencia de lotes.

A este respecto, sobre todo la proporción de ácido siálico desempeña hasta la fecha una función importante como parámetro ya que es conocido que la presencia o la ausencia de ácido siálico participa de forma decisiva en la semivida en circulación de una glicopoteína en sangre o su eliminación.

En el caso de la eritropoyetina (EPO), la electroforesis capilar de zona (ECZ) representa un procedimiento importante para caracterizar la sialoglicoproteína y establecer su eficacia biológica. Este examen se describe en la Farmacopea europea (Ph. Eur.) y se requiere para cada lote clínico de EPO como prueba relevante para la aprobación.

Actualmente se aspira a sustituir la preparación de referencia biológica 1, (PRB1) de EPO por la preparación de referencia biológica 2 (PRB2). Para esto, la PRB1 de EPO se midió en el marco de un estudio de anillo con la "preparación de referencia biológica candidata 2" ("candidate biological reference preparation 2") (PRBc2) de EPO, entre otras cosas con ayuda de la electroforesis capilar de zona y los datos analíticos obtenidos en esto se compararon detalladamente (M-E. Behr-Gross, A. Daas, A. F. Bristow, Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 2, Pharmeuropa Bio 2004-1, 23-33).

Por tanto, la presente invención se basó en el objetivo de proporcionar un procedimiento que permitiera representar los complejos datos de la electroforesis capilar de zona en un modo comparativamente simplificado y no obstante de gran valor, fiable y válido en comparación con la Farmacopea europea o con Behr-Gross y col. (2004) debiendo ser el procedimiento adecuado para simplificar o sustituir los conocidos procedimientos *in vivo,* por ejemplo, para determinar la biodisponibilidad y la consistencia de lotes de sialoglicoproteínas.

Este objetivo se alcanza mediante el procedimiento con las características de la reivindicación 1. Las otras reivindicaciones dependientes muestran variantes ventajosas. En la reivindicación 18 se mencionan usos según la invención.

Se ha establecido sorprendentemente que el número de isoformas I determinado mediante la ECZ de una sialoglicoproteína guarda una excelente relación con la biodisponibilidad *in vivo* y la actividad biológica de una sialoglicoproteína. Debido a la buena reproducibilidad y a la exactitud analítica de esta determinación, I también puede utilizarse ventajosamente en un procedimiento para establecer la consistencia de lotes de una glicopoteína terapéutica.

Las presentes investigaciones llevan a la conclusión de que el "estado de isoformas" puesto de manifiesto en la ECZ y por tanto el "estado de glicosilación" de una sialoglicoproteína puede describirse de forma muy útil y de gran valor con el número sencillo I. Por tanto, mediante la determinación de I puede compararse de forma sencilla la distribución de isoformas de una glicopoteína de lote a lote o en el marco de estudios de estabilidad.

Por el "estado de glicosilación" de una glicoproteína se entiende en relación con la presente invención la composición de los glicanos de la glicopoteína a partir de estructuras de oligosacáridos bi, tri y tetraantenarios y su grado de sialilación respectivo, es decir, el contenido de ácido siálico unido, así como el contenido de grupos sulfato o fosfato, incluida la aportación de la glicosilación de las cadenas de azúcar sialiladas unidas O-glicosídicamente.

Por la biodisponibilidad de un agente terapéutico de glicopoteína se entiende la capacidad del agente terapéutico para desarrollar *in vivo* su actividad biológica o eficacia terapéutica. En consecuencia, la biodisponibilidad y la actividad biológica se determinan decisivamente del comportamiento de eliminación *in vivo*, es decir, la eliminación del agente terapéutico de la circulación sanguínea. Por ejemplo, de la EPO se sabe que en ausencia del ácido N-acetilneuramínico unido terminalmente a las cadenas de azúcar N-glicosídicas se elimina muy rápido mediante el denominado "receptor asialo" en el hígado de la circulación sanguínea y así no puede desarrollar su eficacia biológica.

El número de isoformas I de una glicopoteína terapéutica guarda relación de forma sorprendente con la semivida *in vivo* de la glicopoteína y así representa un parámetro de medición completamente nuevo que permite calcular por adelantado de una forma muy sencilla el comportamiento de eliminación que cabe esperar para la glicopoteína terapéutica de lote a lote. Por consiguiente, I también hace posible una declaración sobre la eficacia biológica que cabe esperar para la glicopoteína de lote a lote. Por tanto, en la determinación de I de una glicoproteína terapéutica de lote a lote puede renunciarse, por ejemplo, a la determinación muy costosa, que requiere mucho tiempo, cara y muy imprecisa de la eficacia terapéutica de la glicoproteína en experimentos en animales (ensayo *in vivo*).

Esto hace posible además una aportación nueva y considerable a la reducción de experimentos en animales y así a una mejor protección de los animales. El número de isoformas I representa al mismo tiempo una medida especialmente adecuada de la consistencia de lotes de la glicopoteína.

El cálculo del número de isoformas I de una sialoglicoproteína se realiza separando inicialmente la sialoglicoproteína mediante electroforesis capilar de zona. Basándose en la evaluación de la electroforesis capilar de zona, entonces se forma respectivamente un producto $i_n = m_n \cdot p_n$ a partir de la proporción p del área de pico en porcentaje obtenida mediante la electroforesis capilar de zona de la isoforma n ($p_n$) con un multiplicador $m_n$ siendo n un número entero de 1 a 14, $m_n = x_n \cdot n$ y $x_n$ un número discrecional del grupo de los números reales excepto 0. Los productos así obtenidos $i_1$ a $i_n$ se suman a continuación para dar el número de isoformas I.

$$I = \sum_{i=1}^{i=n} i_n$$

La suma de las proporciones de isoformas en porcentaje da el 100%.

Por ejemplo, $x_n$ para cada isoforma es = 1, por lo que el multiplicador se corresponde con el número de la isoforma correspondiente.

Por ejemplo, sin embargo, $x_n$ también puede ser distinto para cada isoforma y diferente de 1, por lo que el multiplicador es distinto para cada isoforma. Preferiblemente, $x_n$ es en este caso un número variable que se calcula a partir de la actividad biológica específica de la isoforma respectiva. La actividad específica de las isoformas, por ejemplo, de eritropoyetina recombinante de células CHO se encuentra, por ejemplo, en el documento EP 0 428 267 B1 (1997; prioridad US 421444 (1989).

La determinación de I se verificó en distintos lotes de una glicopoteína terapéutica y se aplicó a la comparación conocida en la bibliografía de la PRB1 de EPO con la PRBc2 de EPO (M-E. Behr-Gross, A. Daas, A. F. Bristow, Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 2, Pharmeuropa Bio 2004-1, 23-33). En este caso pudo mostrarse que el número de isoformas I puede considerarse un parámetro nuevo, de gran valor, fiable y característico de la distribución de isoformas o la glicosilación de proteínas.

Mediante los siguientes ejemplos deberá explicarse más detalladamente el procedimiento según la invención sin desear que éste se limite a las formas de realización representadas en este documento.

A continuación se encuentra como ejemplo la determinación de I a partir del Collaborative Study de EPO (Behr-Gross y col., 2004). Para esto se evaluaron los datos publicados en Behr-Gross y col. (2004). Los resultados obtenidos en el estudio se resumen para la PRB1 en la tabla 1 o la tabla 3 y para la PRBc2 en la tabla 2 o la tabla 4.

El estudio ha mostrado ligeras diferencias entre la PRB1 y la PRBc2 que según la opinión de Behr-Gross y col. (2004) requiere una adaptación de la monografía de la Ph. Eur.

La proporción de isoforma 3 es en la PRBc2 en promedio inferior a la requerida en la monografía de la Ph. Eur., mientras que la isoforma 7 se encuentra muy ligeramente por debajo del límite superior de la especificación actual de la Ph. Eur.

La presente invención para la evaluación *in vitro* de la calidad y la actividad biológica de EPO en particular o de la calidad de sialoglicoproteínas en general tiene en comparación con el estado de la técnica (Hermentin y col. (1996) Glycobiology 6, 217-230; documento EP 0843821 B1 (2001), prioridad DE 19527054 de 26/07/1995) la marcada ventaja de que la determinación de isoformas puede realizarse incluso con la glicopoteína nativa y en un laboratorio de proteínas normal, siempre y cuando el laboratorio disponga de un aparato de electroforesis capilar. A diferencia, el estado de la técnica requiere para determinar el número de carga Z hipotético de una glicopoteína, con cuya ayuda puede determinarse igualmente la actividad biológica de EPO, pero en un modo mucho más difícil (Hermentin y col., véase arriba), un marcado peritaje para la liberación y el aislamiento del conjunto de N-glicanos (las cadenas de azúcar unidas N-glicosídicamente) de la glicopoteína, que luego se separa y se analiza con respecto a la carga mediante cromatografía de intercambio aniónico, especialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante ("high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection") (HPAEC-PAD) Hermentin y col., véase arriba).

El número de isoformas I, cuya determinación ya se realiza con la glicopoteína intacta, hizo posible proporcionar una información similarmente valiosa sobre la eficacia biológica, semivida biológica, estabilidad y consistencia de lotes de EPO en general o de sialoglicoproteínas que llevan N-glicanos en particular, como el número de carga Z hipotético (Hermentin y col., véase arriba), cuya determinación requiere sin embargo una técnica y un peritaje claramente más costoso y exigente.

Mientras que la electroforesis capilar de la EPO de la Farmacopea europea (Monograph 1316; Ph. Eur. Suppl. 5.3. (Erythropoietin concentrated solution), Strasbourg, France, Council of Europe; 2005) se prescriba obligatoriamente como prueba de aprobación para la eritropoyetina, el número de isoformas I presentado en este documento según la invención podrá representar un parámetro de evaluación y aprobación sencillo, concluyente y fiable de la calidad de preparados de EPO, es decir, su eficacia biológica, semivida biológica, consistencia de lotes y estabilidad durante el almacenamiento.

La invención se explica más detalladamente mediante los siguientes ejemplos 1 a 4.

Ejemplo 1

Cálculo del número de isoformas I para la PRB1 de EPO mediante los datos publicados por Behr-Gross y col. (2004) de la distribución de isoformas de la PRB1 de EPO; en este caso es válido el producto $i_n = m_n \cdot p_n$ con $m_n = x_n \cdot n$ para cada isoforma $x_n = 1$; n se corresponde con el número de isoformas respectivo.

(Tabla pasa a página siguiente)

**Tabla 1**

| PRB1 | Lab 2 | | Lab 3 | | Lab 8 | | Lab 9 | | Lab 10 | | Lab 11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I 0 | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ |
| I 1 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 1,0 |
| I 2 | 1,9 | 3,8 | 2,5 | 5,0 | 3,1 | 6,2 | 2,2 | 4,4 | 2,4 | 4,8 | 2,7 | 5,4 |
| I 3 | 5,9 | 17,7 | 6,0 | 18,0 | 6,9 | 20,7 | 5,6 | 16,8 | 6,2 | 18,6 | 6,2 | 18,6 |
| I 4 | 18,4 | 73,6 | 18,3 | 73,2 | 17,8 | 71,2 | 19,1 | 76,4 | 17,7 | 70,8 | 19,0 | 76,0 |
| I 5 | 29,6 | 148,0 | 29,0 | 145,0 | 28,2 | 141,0 | 30,1 | 150,5 | 28,8 | 144,0 | 28,8 | 144,0 |
| I 6 | 28,7 | 172,2 | 27,9 | 167,4 | 27,5 | 165,0 | 24,4 | 146,4 | 28,5 | 171,0 | 27,8 | 166,8 |
| I 7 | 14,4 | 100,8 | 14,2 | 99,4 | 14,1 | 98,7 | 16,1 | 112,7 | 14,6 | 102,2 | 13,7 | 95,9 |
| I 8 | 0,7 | 5,6 | 1,3 | 10,4 | 1,4 | 11,2 | 1,8 | 14,4 | 0,9 | 7,2 | 0,8 | 6,4 |
| **Total** | 100,0 | **522,1** | 100,0 | **519,2** | 100,0 | **515,0** | 100,1 | **522,4** | 99,9 | **519,4** | 100,0 | **514,1** |

Como es evidente de la tabla 1, para la PRB1 a partir de los datos de seis laboratorios que participaron en el Collaborative Study pudieron determinarse los siguientes números de isoformas:

| | | |
|---|---|---|
| Lab 2: | I = 522,1 | (redondeado: I = 522) |
| Lab 3: | I = 519,2 | (redondeado: I = 519) |
| Lab 8: | I = 515,0 | (redondeado: I = 515) |
| Lab 9: | I = 522,4 | (redondeado: I = 522) |
| Lab 10: | I = 519,4 | (redondeado: I = 519) |
| Lab 11: | I = 514,1 | (redondeado: I = 514) |
| Media: | I = 518,7 | (redondeado: I = 519) |
| Desviación estándar: | | DE = 3,5 |
| Coeficiente de variación: | | CV = 0,7% |

Los datos de la tabla 1 muestran que cuando para cada isoforma $x_n = 1$, a partir de los datos de ECZ para la PRB1 de los seis laboratorios que han participado en este Collaborative Study puede calcularse un número de isoformas I entre 514 y 522, que establece la buena comparabilidad de los análisis de ECZ de laboratorio a laboratorio, así como la alta precisión del número de isoformas I.

Ejemplo 2

Cálculo del número de isoformas I para la PRBc2 de EPO mediante los datos publicados por Behr-Gross y col. (2004) de la distribución de isoformas de la PRBc2 de EPO; en este caso es válido el producto $i_n = m_n \cdot p_n$ con $m_n = x_n \cdot n$ para cada isoforma $x_n = 1$; n se corresponde con el número de isoformas respectivo.

(Tabla pasa a página siguiente)

**Tabla 2**

| PRBc2 | Lab 2 | | Lab 3 | | Lab 8 | | Lab 9 | | Lab 10 | | Lab 11 | | Lab 12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I 0 | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ |
| I 1 | | | | | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| I 2 | 1,0 | 2,0 | 1,0 | 2,0 | 1,6 | 3,2 | 0,9 | 1,8 | 1,3 | 2,6 | 1,5 | 3,0 | 1,0 | 2,0 |
| I 3 | 4,5 | 13,5 | 4,9 | 14,7 | 5,1 | 15,3 | 3,8 | 11,4 | 4,6 | 13,8 | 5,2 | 15,6 | 5,3 | 15,9 |
| I 4 | 16,8 | 67,2 | 16,8 | 67,2 | 16,2 | 64,8 | 17,3 | 69,2 | 15,4 | 61,6 | 19,0 | 76,0 | 17,3 | 69,2 |
| I 5 | 27,1 | 135,5 | 27,2 | 136,0 | 26,3 | 131,5 | 27,8 | 139,0 | 26,8 | 134,0 | 28,7 | 143,5 | 26,9 | 134,5 |
| I 6 | 30,4 | 182,4 | 29,7 | 178,2 | 30,0 | 180,0 | 29,4 | 176,4 | 30,4 | 182,4 | 30,0 | 180,0 | 29,6 | 177,6 |
| I 7 | 18,6 | 130,2 | 18,3 | 128,1 | 18,6 | 130,2 | 18,6 | 130,2 | 19,2 | 134,4 | 15,2 | 106,4 | 18,1 | 126,7 |
| I 8 | 1,7 | 13,6 | 2,1 | 16,8 | 1,8 | 14,4 | 1,8 | 14,4 | 1,9 | 15,2 | 0,1 | 0,8 | 1,7 | 13,6 |
| **Total** | 100,1 | **544,4** | 100,0 | **543,0** | 99,9 | **539,7** | 100,1 | **542,9** | 100,0 | **544,4** | 100,0 | **525,6** | 100,1 | **539,7** |

Como es evidente de la tabla 2, para la PRBc2 a partir de los datos de seis laboratorios que participaron en el Collaborative Study pudieron determinarse los siguientes números de isoformas:

| | | |
|---|---|---|
| Lab 2: | I = 544,4 | (redondeado: I = 544) |
| Lab 3: | I = 543,0 | (redondeado: I = 543) |
| Lab 8: | I = 539,7 | (redondeado: I = 540) |
| Lab 9: | I = 542,9 | (redondeado: I = 543) |
| Lab 10: | I = 544,4 | (redondeado: I = 544) |
| Lab 11: | I = 525,6 | (redondeado: I = 526) |
| Lab 12: | I = 539,7 | (redondeado: I = 540) |
| Valor medio: | VM = 540,0 | (redondeado: I = 540) |
| Desviación estándar: | DE = 6,6 | |
| Coeficiente de variación: | CV = 1,2% | |

A partir de los datos de la tabla 2 llama la atención que cuando para cada isoforma $x_n$= 1, los datos de ECZ para la PRBc2 de los siete laboratorios que han participado en este Collaborative Study, con excepción del laboratorio 11, puede calcularse un número de isoformas I entre 540 y 544, que establece la buena comparabilidad de los análisis de ECZ de laboratorio a laboratorio, así como la alta precisión del número de isoformas I.

Para el laboratorio 11 llama la atención en esta posible evaluación según la presente invención que el número de isoformas calculado con I = 526 se encuentre significativamente más bajo que en los restantes laboratorios (I = 540-544), lo que sugiere para el laboratorio 11 para la PRBc2 (en comparación con los restantes laboratorios) una ligera desviación (eventualmente un ligero error analítico).

Esta circunstancia sólo es evidente mediante esta posible evaluación según la presente invención del número de isoformas I, lo que establece el alto valor informativo de este número de isoformas I respecto a la distribución de isoformas de EPO en particular o de sialoglicoproteínas en general.

Por lo demás, la diferencia descrita en el Collaborative Study entre la PRB1 de EPO y la PRBc2 de EPO es evidente de forma sencilla y concluyente mediante el número de isoformas. Para la PRB1 de EPO se determinó un número de isoformas medio de I = 519, mientras que para la PRBc2 de EPO se calculó un número de isoformas medio de I = 540. Esta circunstancia establece el alto valor informativo del número de isoformas I respecto a la calidad de EPO en general o de sialoglicoproteínas en particular y la aptitud del número de isoformas I como una característica de calidad de la consistencia de lotes, la estabilidad durante el almacenamiento, la semivida biológica y la eficacia biológica de una glicopoteína terapéutica.

Ejemplo 3

Cálculo del número de isoformas I para la PRB1 de EPO mediante los datos publicados por Behr-Gross y col. (2004) de la distribución de isoformas de la PRB1 de EPO considerando la actividad específica de las isoformas individuales según el documento EP 0 428 267 B1 (1996; prioridad US 421444 (1989)) basándose en la determinación de concentración a 280 nm.

En este caso es válido en el producto $i_n = m_n \cdot p_n$ con $m_n = x_n \cdot n$ para $x_n$ respectivamente el número citado en la columna U/mg (la actividad específica de isoformas [U/mg] según el documento EP 0 428 267 B1) dividido entre 100; en este caso es válido para n respectivamente n = 1. El número de isoformas I respectivo refleja así de forma especialmente acertada la actividad biológica del producto de EPO.

**Tabla 3**

| PRB1 | | | Lab 2 | | Lab 3 | | Lab 8 | | Lab 9 | | Lab 10 | | Lab 11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I 0 | U/mg | $x_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ |
| I 1 | 50300 | 503 | 0,4 | 201 | 0,8 | 402 | 1,0 | 503 | 0,8 | 402 | 0,8 | 402 | 1,0 | 503 |
| I 2 | 70600 | 706 | 1,9 | 1341 | 2,5 | 1765 | 3,1 | 2189 | 2,2 | 1553 | 2,4 | 1694 | 2,7 | 1906 |
| I 3 | 96600 | 966 | 5,9 | 5699 | 6,0 | 5796 | 6,9 | 6665 | 5,6 | 5410 | 6,2 | 5989 | 6,2 | 5989 |
| I 4 | 170300 | 1703 | 18,4 | 31335 | 18,3 | 31165 | 17,8 | 30313 | 19,1 | 32527 | 17,7 | 30143 | 19,0 | 32357 |
| I 5 | 255800 | 2558 | 29,6 | 75717 | 29,0 | 74182 | 28,2 | 72136 | 30,1 | 76996 | 28,8 | 73670 | 28,8 | 73670 |
| I 6 | 258400 | 2584 | 28,7 | 74161 | 27,9 | 72094 | 27,5 | 71060 | 24,4 | 63050 | 28,5 | 73644 | 27,8 | 71835 |
| I 7 | 258700 | 2587 | 14,4 | 37253 | 14,2 | 36735 | 14,1 | 36477 | 16,1 | 41651 | 14,6 | 37770 | 13,7 | 35442 |
| I 8 | 205800 | 2058 | 0,7 | 1441 | 1,3 | 2675 | 1,4 | 2881 | 1,8 | 3704 | 0,9 | 1852 | 0,8 | 1646 |
| **Total** | | | 100,0 | **227148** | 100,0 | **224815** | 100,0 | **222224** | 100,1 | **225293** | 99,9 | **225166** | 100,0 | **223349** |

Como es evidente de la tabla 3, para la PRB1 a partir de los datos de seis laboratorios que participaron en el Collaborative Study pudieron determinarse los siguientes números de isoformas alternativos asimismo posibles según la presente invención:

| | |
|---|---|
| Lab 2: | I = 227148 |
| Lab 3: | I = 224815 |
| Lab 8: | I = 222224 |
| Lab 9: | I = 225293 |
| Lab 10: | I = 225166 |
| Lab 11: | I = 223349 |
| Media: | I = 224666 |
| Desviación estándar: | DE = 1704 |
| Coeficiente de variación: | CV = 0,8% |

Los datos de la tabla 3 muestran que a partir de los datos de ECZ para la PRB1 de los seis laboratorios que han participado en este Collaborative Study puede calcularse un número de isoformas I alternativo (opcionalmente posible) entre 222224 y 227148, que establece la buena comparabilidad de los análisis de ECZ de laboratorio a laboratorio, así como también la alta precisión del número de isoformas I alternativamente posible.

Ejemplo 4

Cálculo del número de isoformas I para la PRBc2 de EPO mediante los datos publicados por Behr-Gross y col. (2004) de la distribución de isoformas de la PRBc2 de EPO considerando la actividad específica de las isoformas individuales según el documento EP 0 428 267 B1 (1996; prioridad US 421444 (1989) basándose en la determinación de concentración a 280 nm.

En este caso es válido en el producto $i_n = m_n \cdot p_n$ con $m_n = x_n \cdot n$ para $x_n$ respectivamente el número citado en la columna U/mg (la actividad específica de isoformas [U/mg] según el documento EP 0 428 267 B1) dividido entre 100; en este caso es válido para n respectivamente n = 1. El número de isoformas I respectivo refleja así de forma especialmente acertada la actividad biológica del producto de EPO.

(Tabla pasa a página siguiente)

**Tabla 4**

| PRBc2 | | | Lab 2 | | Lab 3 | | Lab 8 | | Lab 9 | | Lab 10 | | Lab 11 | | Lab 12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I 0 | U/mg | $x_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ | Área % | $i_n$ |
| I 1 | 50300 | 503 | | 0 | | 0 | 0,3 | 151 | 0,5 | 252 | 0,4 | 201 | 0,3 | 151 | 0,2 | 101 |
| I 2 | 70600 | 706 | 1,0 | 706 | 1,0 | 706 | 1,6 | 1130 | 0,9 | 635 | 1,3 | 918 | 1,5 | 1059 | 1,0 | 706 |
| I 3 | 96600 | 966 | 4,5 | 4347 | 4,9 | 4733 | 5,1 | 4927 | 3,8 | 3671 | 4,6 | 4444 | 5,2 | 5023 | 5,3 | 5120 |
| I 4 | 170300 | 1703 | 16,8 | 28610 | 16,8 | 28610 | 16,2 | 27589 | 17,3 | 29462 | 15,4 | 26226 | 19,0 | 32357 | 17,3 | 29462 |
| I 5 | 255800 | 2558 | 27,1 | 69322 | 27,2 | 69578 | 26,3 | 67275 | 27,8 | 71112 | 26,8 | 68554 | 28,7 | 73415 | 26,9 | 68810 |
| I 6 | 258400 | 2584 | 30,4 | 78554 | 29,7 | 76745 | 30,0 | 77520 | 29,4 | 75970 | 30,4 | 78554 | 30,0 | 77520 | 29,6 | 76486 |
| I 7 | 258700 | 2587 | 18,6 | 48118 | 18,3 | 47342 | 18,6 | 48118 | 18,6 | 48118 | 19,2 | 49670 | 15,2 | 39322 | 18,1 | 46825 |
| I 8 | 205800 | 2058 | 1,7 | 3499 | 2,1 | 4322 | 1,8 | 3704 | 1,8 | 3704 | 1,9 | 3910 | 0,1 | 206 | 1,7 | 3499 |
| **Total** | | | 100,1 | **233156** | 100,0 | **232036** | 99,9 | **230414** | 100,1 | **232924** | 100,0 | **232477** | 100,0 | **229053** | 100,1 | **231008** |

Como es evidente de la tabla 4, para la PRBc2 a partir de los datos de siete laboratorios que participaron en el Collaborative Study pudieron determinarse los siguientes números de isoformas alternativos asimismo posibles según la presente invención:

| | |
|---|---|
| Lab 2: | I = 233156 |
| Lab 3: | I = 232036 |
| Lab 8: | I = 230414 |
| Lab 9: | I = 232924 |
| Lab 10: | I = 232477 |
| Lab 11: | I = 229053 |
| Lab 12: | I = 231008 |
| Valor medio: | VM = 231581 |
| Desviación estándar: | DE = 1493 |
| Coeficiente de variación: | CV = 0,6% |

A partir de los datos de la tabla 4 llama la atención que a partir de los datos de ECZ para la PRBc2 de los siete laboratorios que han participado en este Collaborative Study puede calcularse un número de isoformas I alternativo (opcionalmente posible) entre 229053 y 233156 que establece la buena comparabilidad de los análisis de ECZ de laboratorio a laboratorio, así como también la alta precisión del número de isoformas I.

Según esta evaluación (opcionalmente posible), los resultados del laboratorio 11 son poco llamativos en comparación con los restantes laboratorios.

Por lo demás, la diferencia descrita en el Collaborative Study entre la PRB1 de EPO y la PRBc2 de EPO también es evidente de forma sencilla y concluyente mediante este cálculo opcionalmente posible según la presente invención del número de isoformas. Para la PRB1 de EPO se determinó un número de isoformas medio de I = 224666, mientras que para la PRBc2 de EPO se calculó un número de isoformas medio de I = 231581. Este cálculo opcionalmente posible según la presente invención del número de isoformas también establece el alto valor informativo del número de isoformas respecto a la calidad de EPO en general o de sialoglicoproteínas en particular y la aptitud del número de isoformas I como una característica de calidad de la consistencia de lotes, la estabilidad durante el almacenamiento, la semivida biológica y la eficacia biológica de una glicopoteína terapéutica.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para **caracteriza**r la calidad de sialoglicoproteínas mediante un número de isoformas I, en el que

a) la sialoglicoproteína se separa mediante electroforesis capilar de zona,

b) el producto $i_n = m_n \cdot p_n$ se forma a partir de la proporción p del área de pico en porcentaje obtenida mediante la electroforesis capilar de zona de la isoforma n ($p_n$) con un multiplicador $m_n$ siendo n un número entero de 1 a 14, $m_n = x_n \cdot n$ y $x_n$ un número discrecional del grupo de los números reales excepto 0, y

c) los productos así obtenidos $i_1$ a $i_n$ se suman para dar el número de isoformas I

$$I = \sum_{i=1}^{i=n} i_n, \quad \text{y}$$

d) se compara el número de isoformas I obtenido de dicha sialoglicoproteína con el número de isoformas I de un patrón de sialoglicoproteína.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la sialoglicoproteína es una sialoglicoproteína humana.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la sialoglicoproteína es una sialoglicoproteína humana recombinante.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la sialoglicoproteína es eritropoyetina.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la sialoglicoproteína es hormona estimulante del folículo.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la sialoglicoproteína es gonadotropina coriónica.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque n es un número entero de 1 a 8.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque $x_n = 1$.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque $x_n$ se calcula a partir de la actividad específica de la isoforma n respectiva o porque en $x_n$ entra la actividad específica de la isoforma n respectiva; en este caso n es preferiblemente n = 1.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el número de isoformas I representa una característica de calidad de la eficacia biológica de la sialoglicoproteína.

11. Procedimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la eficacia biológica de la sialoglicoproteína se evalúa mediante la comparación con el número de isoformas determinado de un patrón de sialoglicoproteína.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el número de isoformas I representa una característica de calidad de la consistencia de lotes (consistencia lote a lote) de la sialoglicoproteína.

13. Procedimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la consistencia de lotes de la sialoglicoproteína se evalúa mediante la comparación con el número de isoformas determinado de un patrón de sialoglicoproteína.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el número de isoformas I representa una característica de calidad de la estabilidad durante el almacenamiento de la sialoglicoproteína.

15. Procedimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la estabilidad durante el almacenamiento de la sialoglicoproteína se evalúa mediante la comparación con el número de isoformas determinado de un patrón de sialoglicoproteína.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el número de isoformas I representa una característica de calidad de la semivida biológica de la sialoglicoproteína.

17. Procedimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la semivida biológica de la sialoglicoproteínas se evalúa mediante la comparación con el número de isoformas determinado de un patrón de sialoglicoproteína.

18. Uso del número de isoformas I determinado mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17 como característica de calidad de la eficacia biológica de la sialoglicoproteína, como característica de calidad de la consistencia de lotes (consistencia lote a lote) de la sialoglicoproteína, como característica de calidad de la estabilidad durante el almacenamiento de la sialoglicoproteína o como característica de calidad de la semivida biológica de la sialoglicoproteína.